ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE : 1982 THESE : 73

EVALUATION DU RISQUE CANCEROGENE : BASES THEORIQUES ET ANALYSE CRITIQUE DES TESTS UTILISES

THESE

Pour le Doctorat Vétérinaire
(Diplôme d'Etat)
Présentée et soutenue publiquement en 1982
devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse

par

Frédéric, Marcel, Georges LACHERETZ

Né le 12 Mars 1956 à LILLE (Nord)

Membres du Jury

Président : ..... Monsieur GUILHEM
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Assesseurs : ..... Monsieur VAN HAVERBEKE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Monsieur CABANIE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

UNIV.
LEIDEN
NED.

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE : 1982 THESE : 73

EVALUATION DU RISQUE CANCEROGENE : BASES THEORIQUES ET ANALYSE CRITIQUE DES TESTS UTILISES

THESE

Pour le Doctorat Vétérinaire
(Diplôme d'Etat)
Présentée et soutenue publiquement en 1982
devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse

par

Frédéric, Marcel, Georges LACHERETZ

Né le 12 Mars 1956 à LILLE (Nord)

Membres du Jury

Président : ..... Monsieur GUILHEM
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Assesseurs : ..... Monsieur VAN HAVERBEKE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Monsieur CABANIE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : ..... M.LAUTIE
Directeur honoraire : ..... M. FLORIO
Professeurs honoraires : ..... M. BRIZARD
..... M. SAURAT

PERSONNEL ENSEIGNANT
CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire ..... M. GODFRAIN
Professeur sans chaire ..... Mme BURGAT-SACAZE

Pharmacie et Toxicologie

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Professeur titulaire ..... M. RICO
Professeur sans chaire ..... M. BRAUN
Maître Assistant ..... M. BENARD

Physique Biologique et Médicale
Chimie Biologique et Médicale
Informatique biologique et médicale

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire ..... M. PAVAUX
Maître Assistant ..... M. LIGNEREUX
Maître Assistant ..... M. SAUTET

Organogénèse - Tératologie
Anatomie Générale - Anatomie Appliquée

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE. PHARMACODYNAMIE ET THERAPEUTIQUE

Professeur titulaire ..... M. RUCKEBUSCH
Professeur sans chaire ..... M. FARGEAS
Maître Assistant Agrégé ..... M. TOUTAIN

Physiologie - Pharmacodynamie - Thérapeutique

CHAIRE D'HISTOLOGIE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titulaire ..... M. VAN HAVERBEKE
Professeur sans chaire ..... M. CABANIE
Maître Assistant Agrégé ..... M. MAGNOL

Histologie - Embryologie
Anatomie Pathologique - Clinique

CHAIRE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire ..... M. LABIE
Maître de Conférences ..... M. EECKHOUTTE
Maître Assistant Agrégé ..... Mme BENARD

Hygiène - Inspection - Contrôle et Technologie des denrées alimentaires d'origine animale - Clinique

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire ..... M. DORCHIES
Maître de Conférences ..... M. FRANC
Maître Assistant ..... M. DUCOS DE LAHITTE

Zoologie appliquée - Ecologie - Parasitologie externe -
Dermatologie - Parasitologie interne - Clinique

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MEDICALE
DES EQUIDES ET CARNIVORES ET DE LEGISLATION

Professeur titulaire ..... M. LESCURE
Maître de Conférences ..... M. GUELFI
Maître Assistant ..... M. REGNIER

Sémiologie et Pathologie Médicale des Equidés et Carnivores
Législation Vétérinaire et Déontologie Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL
ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR

Professeur titulaire ..... M. TOURNUT
Maître de Conférences ..... M. BEZILLE
Maître Assistant ..... M. JOUGLAR

Sémiologie et Pathologie Médicale du bétail et des animaux de basse-cour
Clinique - Consultation itinérante

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Professeur titulaire ..... M. CAZIEUX
Maître de Conférences ..... M. GENEVOIS
Maître-Assistant ..... M. AUTEFAGE
Maître-Assistant ..... M. FAYOLLE

Propédeutique et Sémiologie Chirurgicale - Radiologie - Technique Chirurgicale - Anesthésiologie
Pathologie Chirurgicale - Clinique - Traumatologie - Podologie orthopédique

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire ..... M. FERNEY
Professeur sans chaire ..... M. ROYAL

Pathologie de l'appareil génital et de la mamelle - Sémiologie et Propédeutique - Pathologie de la Reproduction - Obstétrique et pathologie du nouveau-né - Clinique - Consultation itinérante

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES - ZOONOSES -
LEGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire ..... M. CHANTAL
Maître Assistant ..... M. PICAVET

Epidémiologie - Maladies contagieuses - Zoonoses
Législation Sanitaire - Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE GENERALE - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire ..... M. LAUTIE
Maître Assistant ..... M. PELLERIN
Maître Assistant ..... M. MILON

Microbiologie - Immunologie - Pathologie Générale

CHAIRE D'ELEVAGE ET ECONOMIE

Professeur titulaire ..... M. QUEINNEC
Professeur sans chaire ..... M. DARRE
Maître Assistant ..... Mme QUEINNEC

Ethnologie - Génétique animale - Extérieur - Zootechnie et Economie générales - Ethologie appliquée. Sciences, Techniques, Economie de l'Elevage et des Productionsanimales
Insémination artificielle - Organisation de l'Elevage

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire ..... M. FALIU
Professeur sans chaire ..... M. GRIESS
Maître Assistant ..... M. ENJALBERT

Botanique appliquée et Bromatologie - Agronomie - Alimentation

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. les Professeurs : ANGELIER, ARMENGAUD, COMBES, COMBRET, CROS, FERNET, et MAZENC.

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsable des opinions émises par les candidats (Délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole en date du 13 juin 1924).

A notre Président de Thèse

MONSIEUR LE PROFESSEUR GUILHEM

de l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Qui nous fait le très grand honneur d'accepter la présidence de notre Jury de Thèse.

Hommage respectueux.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547621_0071

A Notre Jury de Thèse

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. VAN HAVERBEKE

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Avec la reconnaissance que nous lui devons pour son enseignement et pour l'accueil qu'il a bien voulu nous réserver dans son Service.

Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude et de notre respect.

MONSIEUR LE PROFESSEUR P.CABANIE

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

En remerciement de son accueil et des conseils qu'il nous a souvent prodigués.

Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance.

A mes Parents et Beaux-Parents,

A ma Femme et mes Enfants,

A ma Famille,

A mes Amis.

PLAN

INTRODUCTION

Première Partie : PATHOGÉNIE DU CANCER

I) L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE

I) STRUCTURE ET DUPLICATION DU MATERIEL GENETIQUE

a) Structure et composition

b) Duplication du matériel génétique

&) réplication de l'ADN

&&) division cellulaire

(1) mitose
(2) méiose

II) EXPRESSION ET REGULATION DE L'INFORMATION

a) Expression de l'information

b) Régulation génétique

- régulation qualitative

-- régulation quantitative

III) MODIFICATIONS GENETIQUES ET REPARATIONS

a) Types de mutations

&)remaniements chromosomiques

&&)mutations ponctuelles.

b) Mécanismes d'apparition des mutations

&) transition

&&) délétion

&&&) insertion

c) Protections et réparations de l'ADN

ℵ protections

ℵℵ réparations de l'ADN

II) L'INITIATION , PREMIÈRE ETAPE DE LA CANCÉROGÉNÈSE

I) MECANISMES D'APPARITION DE LA LESION GENETIQUE

a) Origine physique

b) Origine chimique

ℵ modification de la réplication

ℵℵ modification de la structure

(1) cancérogénes directs
(2) procancérogènes

c) Origine biologique

II) CONSEQUENCES BIOLOGIQUES DE LA LESION GENETIQUE

a) Cancérogènes complets

ℵ modifications cellulaires

ℵℵ modifications biochimiques

b) Initiateurs

ℵ critères de diagnose

(1) cytologie
(2) topographie
(3) biochimie

ℵℵ preuves de l'état pré-tumoral

III) La Promotion, deuxième étape de la cancérogénèse

I) FACTEURS EPIGENETIQUES

a) Mise en évidence

b) Définitions

&) cocarcinogènes

&&) promoteurs

II) PROPRIETES ET EFFETS DES PROMOTEURS

a) Comparaison initiateurs-promoteurs

/ initiateurs

// promoteurs

b) Effets d'un promoteur in vitro

/ effets biochimiques

// effets biologiques

III) MECANISME D'ACTION DES PROMOTEURS

Deuxième Partie : PRESENTATION DES TESTS DE CANCEROGENESE

I) Les Tests de Cancérogénèse à long terme

I) ESPECES ET SOUCHES ANIMALES UTILISEES

II- DOSES ADMINISTREES

a) Voie et fréquence d'administration
b) Doses
&) forte dose
&&) faible dose
&&&) dose moyenne

III) CARACTERISTIQUES PRATIQUES

a) Age des animaux
b) Durée des études
c) Nombre d'animaux par lots
d) Composition de l'aliment

IV) ETUDE COMPLENTAIRE

V) CONCEPTION STATISTIQUE DE L'ETUDE

VI) EXAMENS TERMINAUX

a) Autopsie
b) Histopathologie

VII) ETABLISSEMENT DES RAPPORTS

VIII) ANALYSE DES DONNEES

II) Les Tests de mutagénèse

I) MICROORGANISMES PROCARYOTES ET PHAGES

a) Bactéries

&) test de Ames

(1) souches utilisées
(2) principe de base

&&)autres tests

(1) bactéries utilisées
(2) principes de base

b) Phages

&) induction biochimique

&&) inductest

II) MICROORGANISMES EUCARYOTES

a) Levures

b) Champignons

&) Aspergillus nidalans

&&) Neurospora crassa

III) INSECTES

a) Drosophile

b) Autres insectes

IV) CULTURE DE CELLULES DE MAMMIFERES

a) Tests de mutagénèse

I loci mis en cause

(1) loci H GPRTase et TKase

(2) locus ATPase
(3) autres loci

II cellules utilisées

(1) cellules de rongeurs de première explantation
(2) cellules de lignées de rongeurs

a- cellules de hamster chinois V 79
b- cellules d'ovaire de hamster chinois
c- cellules de lymphome de souris L5178 Y
d- hépatocytes de rat adulte

(3) cellules humaines

a- fibroblastes normaux
b- fibroblastes XP
c- lymphoblastes

b) Tests mesurant la réparation ou l'inhibition de réplication de l'ADN

/ mesure de la réparation de l'ADN

(1) test UDS in vitro

a- cellules humaines
b- cellules de rongeurs : test de Williams

(2) test UDS in vivo

a- spermatocytes post-méiotiques de rongeurs
b- épithélium oesophagal de rongeurs

// inhibition de la réplication de l'ADN

(1) in vitro
(2) in vivo

/// fragmentation de l'ADN

c) Tests de transformation in vitro

/ cellules d'embryon de hamster syrien de première explantation

// cellules de lignées

(1) cellules de souris C3H 10 T 1/2 clone 8
(2) cellules de souris Balb/3 T 3

(3) cellules de hamster BHK 21 clone 13
(4) cellules d'embryon de rat
(5) cellules transformées viralement
(6) cellules humaines
(7) cellules épithéliales

V) TESTS SUR MAMMIFERES IN VIVO

a) Effets sur la lignée germinale

.- tests sur locus spécifique
..- test de translocation
...- anomalies numériques du chromosome sexuel
....- test létal dominant
.....- anomalies de sperme

b) Effets sur la lignée somatique

VI) TESTS CYTOGENETIQUES SUR MAMMIFERES

a) Aberrations chromosomiques

§ in vivo
§§ in vitro

b) Echange de chromatides soeurs

§ in vitro
§§ in vivo

c) Test du micronucleus

III) Les Tests à moyen terme

I) INDUCTION DE TUMEURS CUTANEES CHEZ LA SOURIS

II) INDUCTION DE TUMEURS PUMONAIRES CHEZ LA SOURIS

III) INDUCTION DE TUMEURS MAMMAIRES CHEZ LA RATTE SPRAGUE-DAWLEY

IV) INDUCTION DE FOYERS D'ALTERATION DANS LE FOIE DE RONGEURS

Troisième Partie : ANALYSE CRITIQUE DES TESTS DE CANCEROGENESE

I) DÉTECTION DES INITIATEURS

I) TESTS DE MUTAGENESE

a) Facteurs de variabilité

b) Batterie de tests

II) TESTS A MOYEN TERME IN VIVO

III) TESTS A LONG TERME

II) DÉTECTION DES PROMOTEURS

I) TESTS DE MUTAGENESE

II) TESTS A MOYEN TERME IN VIVO

III) TESTS A LONG TERME

III) STRATÉGIES ACTUELLES RECOMMANDÉES

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE.

INTRODUCTION

Le cancer est un fléau médical dont l'impact psychologique est, à juste titre, important. De nombreuses étiologies sont attachées à son apparition, qu'il s'agisse de facteurs physiques, biologiques ou chimiques. Ces derniers sont, à l'heure actuelle, les plus importants quant à leur incidence puisqu'ils sont responsables de 80 % des cancers dûs à l'environnement.

Dès 1775, un médecin anglais, Sir Perceval POTT, associait un cancer du scrotum de ramoneurs à la suie et aux substances qu'elle contient. Cette hypothèse fut confirmée en 1915 par YAMAGIWA et ICHIKAWA qui reproduisirent expérimentalement l'apparition d'un cancer cutané chez le lapin par badigeonnage de goudron de houille à la surface interne de l'oreille. En 1930, KENNAWAY démontra que l'action cancérogène du goudron de houille était liée à la présence d'hydrocarbures polycycliques. Cette relation de cause à effet, entre la structure d'une molécule et son action carcinogène, devait également être démontrée sur l'animal de laboratoire pour de nombreuses autres familles chimiques.

Ainsi, dans le cadre de la protection de l'Homme, une étude expérimentale sur l'animal s'imposait, afin d'apprécier les potentialités carcinogènes de toutes nouvelles molécules.

Parallèlement aux progrès de la biologie moléculaire, la connaissance du mécanisme d'action des agents cancérogènes évoluait vers le concept de cancérogenèse en deux étapes, initiation et promotion,et posait le problème de la mise en évidence des seuls initiateurs ou promoteurs. En effet, l'action isolée de chacun de ces deux agents ne produit aucune tumeur.

Dans une première partie, nous présenterons le système initiation-promotion après avoir rappelé quelques notions concernant son site

d'action, le matériel génétique.

Une deuxième partie nous présentera les tests actuellement utilisés dans l'évaluation des potentialités carcinogènes des agents chimiques.

Dans une dernière partie, nous envisagerons dans quelle mesure ces tests peuvent être utilisés dans la détection des initiateurs et des promoteurs.

Première Partie

PATHOGENIE DU CANCER

La connaissance du mode d'action des agents cancérogènes est apparue de différents horizons : biochimie du cancer, recherche sur les acides nucléiques, génétique, biologie cellulaire et moléculaire...
De ces études, il ressort que la cible de ces agents est l'acide désoxyribonucléique, ADN, et que l'état néoplasique est l'expression d'une altération directe du génotype (112) :

1) de nombreux cancérogènes réagissent de façon covalente avec l'ADN,
2) de nombreux cancérogènes sont aussi mutagènes,
3) des défections du système de réparation de l'ADN prédisposent au développement de tumeur, tel le xeroderma pigmentosum,
4) plusieurs anomalies chromosomiques ou héréditaires sont connues pour prédisposer au développement de tumeur ,
5) la plupart des cancers montrent des anomalies chromosomiques,
6) de nombreux cancers présentent une expression génique aberrante.

Ainsi est-il nécessaire de rappeler tout d'abord quelques notions à propos de l'acide désoxyribonucléique : sa structure, son rôle et ses modifications. Ensuite, nous envisagerons la lésion génétique induite à l'origine du cancer : son apparition et ses conséquences. Cette lésion initiale suffit-elle, à elle seule, à provoquer l'apparition d'une tumeur ou n'est-elle qu'un étape nécessitant une promotion ? Cette question fera l'objet d'un troisième paragraphe.

I) L'Acide Désoxyribonucléique = A.D.N

1) *STRUCTURE ET DUPLICATION DU MATERIEL GENETIQUE*

a) *Structure et composition*

L'ADN est une macromolécule constituée de deux brins juxtaposés parfois comparés aux deux montants verticaux d'une échelle en géométrie plane (81). Dans l'espace, ces deux brins répondent au schéma de la " double hélice" de WATSON et CRICK, mis au point en 1953 à Cambridge.

Chaque brin est constitué par une succession de nucléotides. Un nucléotide est une molécule composite comportant :

. une molécule de sucre = le désoxyribose,
. une molécule d'acide phosphorique,
. une molécule de base azotée.

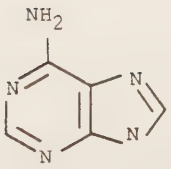
La nature de la base azotée est variable. On en distingue quatre :

. deux bases puriques ou purines = adénine et guanine,
. deux bases pyrimidiques ou pyrimidines = cytosine et thymine.

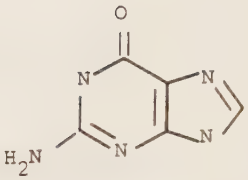
Au sein de cette macromolécule, on compte ainsi quatre types différents de nucléotides. L'ordre selon lequel ils s'enchaînent peut paraître désordonné si l'on ne considère qu'un seul brin.

Par contre, l'étude des deux brins montre que l'association des bases répond à une loi : une purine est toujours liée à une pyrimidine, et inversement. L'acide désoxyribonucléique est donc constitué de deux brins complémentaires : par liaisons hydrogène, la thymine se lie à l'adénine, et la guanine se lie à la cytosine. Ces associations de bases azotées correspondent

PURINES

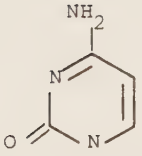


ADENINE

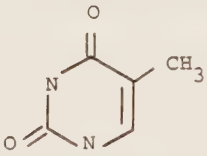


GUANINE

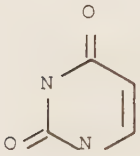
PYRIMIDINES



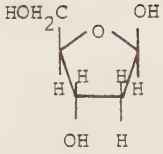
CYTOSINE



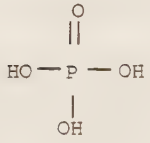
THYMINE



URACILE(°)

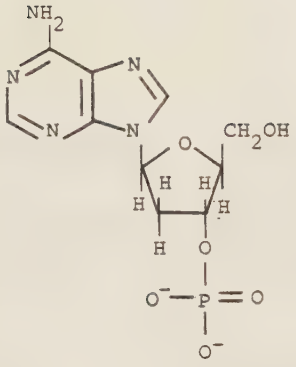


DESOXYRIBOSE



ACIDE PHOSPHORIQUE

(°) Dans l'ARN, l'uracile remplace la thymine.

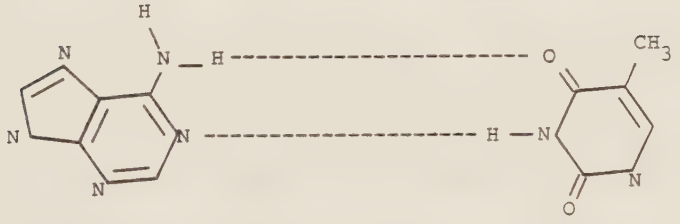


BASE

SUCRE

PHOSPHATE

UN NUCLEOTIDE : L'ACIDE DÉSOXYADÉNYLIQUE



Adénine

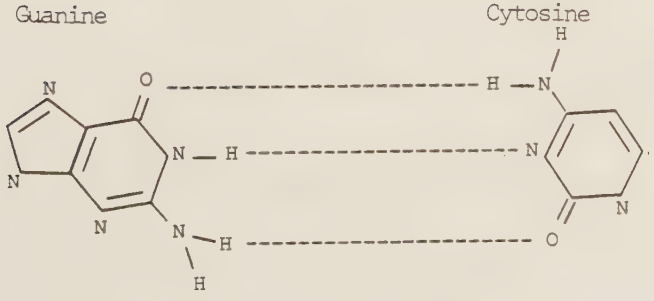
Thymine

A ═ T

G ≡ C

Guanine

Cytosine



APPARIEMENT DES BASES

aux barreaux de l'échelle en géométrie plane. Dans l'espace, la molécule est une double hélice tordue sur elle-même.

Ce modèle explique les particularités biologiques de l'ADN à travers deux notions essentielles : celles de séquence (succession des nucléotides) et de complémentarité (appariement des bases).

b) Duplication du matériel génétique

L'ADN, support de l'information génétique, est un message biologique qui se transmet. Il doit donc assumer une propriété fondamentale : la continuité par reproduction conforme (34).

&) réplication de l'ADN

Par la notion de complémentarité, chaque brin joue le rôle de moule pour la formation à son contact d'une nouvelle chaîne complémentaire. Cette opération, permettant ainsi une reproduction stricte de la séquence des nucléotides, porte le nom de " réplication semi-conservatrice ". Le schéma est le suivant :

- chaque molécule-mère d'ADN voit ses deux brins se séparer par rupture des liaisons hydrogène
- en face de chaque brin est synthétisé le brin complémentaire par appariement des nucléotides libres
- chaque molécule-fille d'ADN comporte en définitive un brin de la molécule-mère et un brin nouvellement synthétisé.

Ce mécanisme a été démontré, en 1958, par MESELSON et STAHL en combinant l'utilisation d'isotopes lourds (^{15}N) et la centrifugation en gradient de densité.

L'ADN du noyau cellulaire est localisé dans des structures hautement organisées, les chromosomes. Sa réplication, entraînant celle des chromosomes, conduit à la division cellulaire.

&&) division cellulaire

La division cellulaire s'opère soit par mitose, soit par méiose, processus au cours desquels les chromosomes passent par un certain nombre d'étapes caractéristiques que nous nous proposons de rappeler brièvement(35).

1) la mitose

Elle a pour effet la formation de deux cellules filles identiques. La morphologie et le mouvement permettent de distinguer arbitrairement quatre étapes. Une cellule qui ne se divise pas est dite en interphase, étape pendant laquelle les chromosomes ne sont pas visibles.

- la prophase = lors de cette première étape, les chromosomes deviennent nettement visibles. Un examen approfondi révèle que chaque chromosome est déjà constitué de deux brins identiques appelés chromatides ; les deux chromatides du chromosome sont appelées chromatides soeurs
- la métaphase = cette deuxième étape est caractérisée par la disposition des chromosomes sur le plan équatorial de la cellule
- l'anaphase = chaque chromatide soeur migre vers un pôle opposé de la cellule
- la télophase = elle est marquée par la reconstitution de deux noyaux et de deux cellules.

2) la méiose

La méiose est le processus qui entraîne une réduction de moitié du nombre des chromosomes. Cet évènement transforme une cellule initiale, dite diploïde, en quatre cellules dites haploïdes.

La méiose se divise également en différentes étapes caractérisées par deux divisions nucléaires successives et d'une seule division des chromosomes.

- la prophase I = divisée en cinq stades (leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse), elle correspond à une division de chaque chromosome en chromatides soeurs, puis à un appariement de chaque paire de chromosomes (chromosomes homologues, ou bivalents). Les bivalents sont étroitement enroulés l'un autour de l'autre. Il est alors possible d'observer un échange génétique entre deux chromatides non soeurs d'un bivalent , appelé un "crossing-over ".
- la métaphase I = chaque bivalent se dispose de part et d'autre de la plaque équatoriale
- l'anaphase I = les chromatides non soeurs de chaque bivalent se séparent et migrent aux pôles opposés de la cellule
- la métaphase et l'anaphase II = elles sont identiques à celles de la mitose. L'anaphase II voit la séparation des chromatides soeurs.

La méiose conduit donc à la formation de quatre cellules, ou tétrades, possédant la moitié du nombre des chromosomes de la cellule initiale.

Deux techniques permettent l'étude de ces deux types de division cellulaire. L'utilisation d'éléments radio-actifs, telle que la thymidine tritiée, conduit à marquer et à visualiser l'ADN qui s'est servi de ces éléments lors de la réplication. Le bloquage de la métaphase est réalisé

par certains anti-mitotiques, telle la colchicine. Les chromosomes sont alors faciles à observer.

2) *EXPRESSION ET REGULATION DE L'INFORMATION*

La succession des nucléotides précédemment décrite est le support chimique de l'information génétique.

a) Expression de l'information

L'ADN est un message codé qui commande les synthèses moléculaires nécessaires à la cellule, telle que la synthèse des protéines (5). Comme les autres macromolécules, les protéines résultent de l'assemblage d'unités élémentaires, les acides aminés. Ceux-ci s'enchaînent selon un ordre strict pour chaque protéine et cette spécificité de structure est en relation directe avec la séquence des nucléotides. Ainsi, à toute modification de nucléotide correspond une modification d'acide aminé dans la protéine.

Comment se réalise la correspondance linéaire entre l'ADN et la protéine puisque le matériel génétique dispose de quatre bases azotées alors qu'il existe vingt acides aminés différents dans les protéines naturelles ? Le problème est donc de savoir combien faut-il de bases pour coder chaque acide aminé.

La solution fut offerte par des statisticiens, puis confirmée par les résultats expérimentaux d'ordre génétique et biochimique : elle répond à l'utilisation d'un code à trois nucléotides, les codons, et propose 64 combinaisons (4^3), toutes connues actuellement.

Tout le processus de la protéosynthèse peut être divisée en deux étapes principales utilisant l'acide ribonucléique, ARN. La première est la transcription d'un séquence de nucléotides d'un brin d'ADN en une séquence complémentaire de nucléotides d'ARN qui porte le message dans le

cytoplasme de la cellule, d'où son nom d'ARN messager, ARN-m. La seconde étape est la traduction de la séquence de nucléotides de l'ARN-m par un processus qui assemble les acides aminés en une séquence spécifique. Chaque acide aminé libre dans le cytoplasme et nécessaire à l'élaboration de la protéine est transféré vers le lieu de la synthèse par un ARN de transfert, ARN-t. Les trois codons ne correspondant à aucun acide aminé représentent le signal d'arrêt de la protéosynthèse.

Néanmoins, l'expression de l'information génétique n'est pas anarchique, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif. Ceci nous conduit à envisager la notion de régulation génétique.

b) Régulation génétique

L'expression de l'information génétique est réglementée à deux niveaux (34).

- régulation qualitative

Toute synthèse d'enzyme est sous la dépendance d'un gène responsable de son aspect qualitatif, c'est-à-dire de la stricte succession des acides aminés. Un tel gène porte le nom de " gène de structure ".

-- régulation quantitative

La quantité d'enzyme synthètisée est modulée par un autre type de gènes, les " gènes régulateurs".Ceux-ci permettent ou non, selon les besoins de la cellule, la fabrication de telle ou telle protéine. Leur découverte, à laquelle JACOB et MONOD ont largement contribué, ouvre des voies nouvelles pour expliquer :

. certaines maladies caractérisées par l'hyperproduction de substances chimiques (porphyries..)

. les phénomènes de différenciation et de dédifférenciation cellulaire, et donc certains cancers dans la mesure où la cellule cancéreuse est histologiquement une cellule jeune.

II

I	U	C	A	G	III
U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA - UAG -	UGU Cys UGC Cys UGA - UGG Try	U C A G
C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU his CAC his CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg	U C A G
A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG Met	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg	U C A G
G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly	U C A G

- Chaque codon ne détermine qu'un seul acide aminé
- Un acide aminé peut être codé par un ou plusieurs codons
- Trois codons ne correspondent à aucun acide aminé :
  UAA , UAG , UGA.

Les idées de JACOB et MONOD sur le contrôle de la régulation de la synthèse sont englobées dans la théorie de l'opéron (53). L'opéron est défini comme un groupe de gènes étroitement liés comprenant un ou plusieurs gènes de structure et un gène opérateur. On sait, par exemple, que l'utilisation du lactose chez Escherichia coli nécessite trois gènes de structure ou que la biosynthèse de l'histidine chez la Salmonelle en nécessite neuf.

Cette étude a souligné l'importance de la séquence de l'information génétique. Toute erreur de succession des nucléotides modifiera la spécificité de structure des molécules synthétisées et engendrera des variations dans le phénotype. Ceci nous conduit à envisager la notion de mutation.

3) *MODIFICATIONS GENETIQUES ET REPARATIONS*

Les mutations sont des modifications brutales, transmissibles héréditairement, dans le contenu ou dans la distribution du matériel génétique (54). Nous envisagerons les types, puis les mécanismes d'apparition des mutations. Enfin, nous étudierons comment l'ADN peut se protéger, et même réparer certaines erreurs.

a) *Types de mutations*

Elles se divisent en deux classes. Celles qui impliquent une modification de la structure ou du nombre des chromosomes : les remaniements chromosomiques , et celles qui relèvent du changement d'un seul gène, au niveau d'un locus : les mutations ponctuelles. Un locus est la place définie d'un gêne sur un chromosome donné (53).

&)remaniements chromosomiques

Les remaniements chromosomiques, ou mutations non ponctuelles, sont des réarrangements de segments de chromosome après division mitotique. On distingue :

- l'aberration numérique = hyperdiploïdie ou polyploïdie, hypoploïdie,
- la cassure, discontinuité supérieure au diamètre du chromatide, le fragment détaché n'est plus dans le prolongement du bras du chromosome,
- le gap = discontinuité inférieure au diamètre du chromatide;
- le chromosome circulaire = les deux bouts du chromosome se joignent et forment un cercle,
- la délétion = double rupture du chromosome avec perte du fragment intermédiaire,
- la figure d'échange = échange au niveau des chromosomes pouvant toucher un ou plusieurs chromosomes,
- la pulvérisation chromosomique = fragmentation du matériel chromosomique,
- la translocation = un segment de chromosome s'attache sur un chromosome non homologue. Elle peut être réciproque.

&&) mutations ponctuelles

Dans la mesure où la modification d'un gène peut affecter la capacité d'un organisme à synthétiser une protéine donnée, trois types de mutation ponctuelle s'imposent :

- la mutation faux-sens = le changement de base azotée implique un changement d'acide aminé dans la protéine,
- la mutation non-sens = le changement de base azotée entraîne un codon non-sens : la protéosynthèse s'arrête et la protéine obtenue est plus courte,
- la mutation par décalage de code (frameshift)= le retrait où l'ajout d'une base azotée entraîne la formation d'une protéine totalement fausse.

Toute mutation provoque, pour un caractère donné, la transformation d'un type sauvage en type mutant. Le retour au caractère sauvage est appelé reversion, ou mutation réverse.

b) Mécanismes d'apparition des mutations

D'un point de vue théorique, une mutation peut résulter d'un manque de fidélité lors de la réplication de l'ADN (duplication anormale d'un ADN intact) ou d'une modification directe de l'ADN (duplication normale d'un ADN modifié) (31).

Pratiquement, nous retiendrons trois mécanismes d'apparition :

- la transition = une purine remplace une autre purine
  une pyrimidine remplace une autre pyrimidine
- la délétion = disparition d'une paire de bases
- l'insertion = addition d'une paire de bases.

&) transition

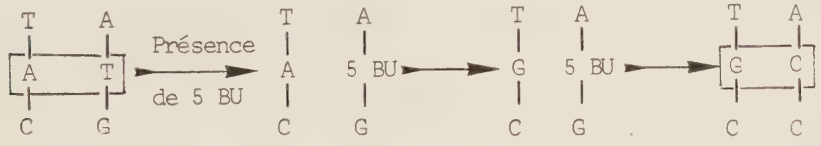
L'exemple est donné par le 5-bromo-uracile (5 BU), analogue structural de la thymine. Celui-ci présente deux propriétés importantes :

- lors de la réplication de l'ADN, il peut remplacer la thymine en face de l'adénine,
- d'autre part, le 5 BU peut également s'incorporer en face la guanine et réciproquement.

Le mécanisme est donc le suivant :

- 1 ère réplication : le 5 BU s'incorpore en face de l'adénine,
- 2 ème réplication : la guanine se place en face du 5 BU,
- 3 ème réplication : la cytosine se place en face de la guanine.

Globalement, nous obtenons une transition puisque la guanine remplace l'adénine, et la cytosine remplace la thymine.



En se reportant au tableau récapitulant toutes les combinaisons de codons, on remarque que les triplets UAC (l'uracile remplace la thymine dans l'ARN) et UGC ne sont pas responsables du même acide aminé.

&&) délétion

La délétion est la perte d'une courte séquence qui s'effectue à la suite d'une double cassure : le fragment intermédiaire se perd. Citons par exemple l'action des radiations ionisantes.

&&&) insertion

Les acridines, substances jaunes telle que la proflavine, sont des molécules plates ayant les dimensions d'une paire de bases. Elles peuvent ainsi s'intercaler, mais n'ayant aucune propriété particulière d'appariement, une base quelconque viendra s'insérer lors de la réplication suivante.

Les acridines sont également responsables de délétion.

L'analyse des fréquences des mutations induites montre que si ces mutations peuvent survenir n'importe où, elles ne surviennent pas pour autant strictement au hasard. Il existe, en effet, des points nettement plus sensibles aux agents mutagènes et qui portent de ce fait l'appellation de " points chauds ".

Jusque là, nous avons montré que l'ADN est une molécule stable pouvant être l'objet de modifications : les mutations . A titre indicatif, les fréquences des mutations spontanées varient entre 10^{-5} et 10^{-9}. Cette fréquence est considérablement augmentée par l'utilisation d'agents mutagènes. Si ce taux paraît relativement faible, il prouve au moins l'existence d'un système de protection et de réparation de l'ADN.

c) Protections et réparations de l'ADN

I protections

L'ADN se situe dans un chromosome, c'est-à-dire au sein d'une gangue de protéines que les agents mutagènes doivent traverser pour atteindre leur lieu d'action. D'autre part, la réplication de l'ADN est sous l'influence de nombreuses enzymes responsables du déroulement et de la conformité du phénomène, évitant ainsi l'incorporation de faux nucléotides.

Malgré cela, des mutations apparaissent . Mais nombre d'entre elles sont rapidement annihilées grâce au système de réparation de l'ADN.

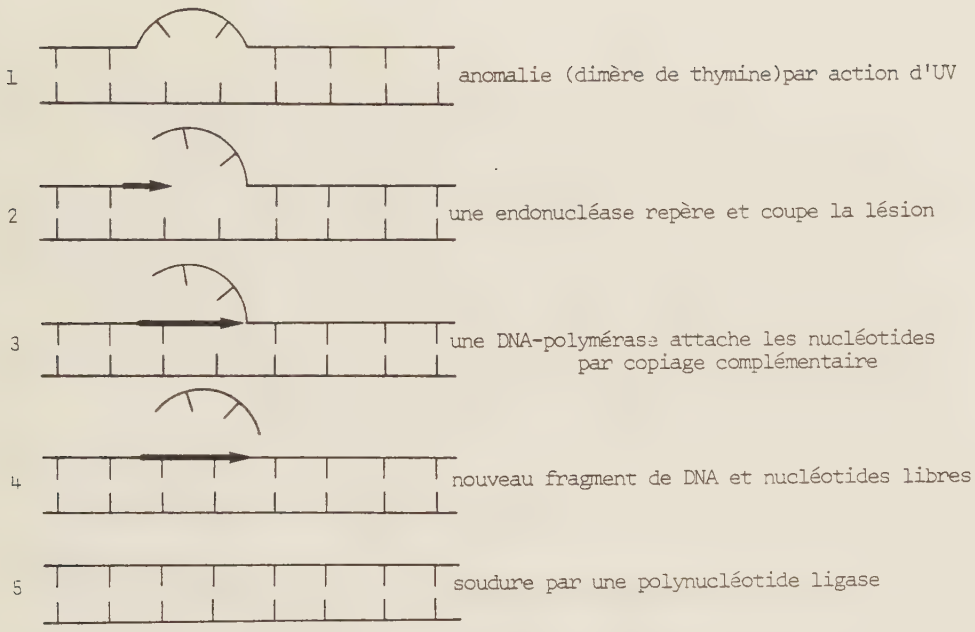
II réparations de l'ADN= DNA repair

La cellule possède un système de réparation capable de repérer une erreur induite par un agent mutagène ou par un manque de fidélité lors de la réplication (104).

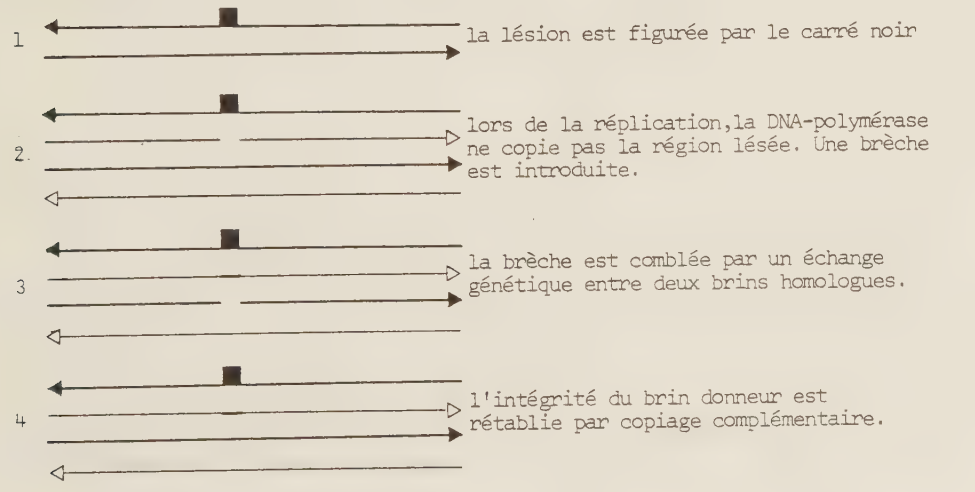
Ce système consiste en l'excision des bases altérées ou inappropriées et la réparation des bases perdues. La lésion du brin simple est reconstituée par copiage complémentaire.

Le processus est expliqué soit par un mécanisme d'excision-re synthèse, soit par un mécanisme post-réplicatif.

MECANISME PAR EXCISION-RESYNTHESE



MECANISME POST-REPLICATIF



RÉPARATION DE L'ADN

Néanmoins, ces systèmes de réparation ne sont pas infaillibles. Il n'y a, en effet, aucune raison pour que la fidélité de la réplication soit absolue. D'autre part, la réparation peut être saturée quand de nombreux agents lèsent, au même moment, un même ADN. Enfin, ce système peut être défectueux ou absent. C'est le cas de certaines souches bactériennes mutant, volontairement sélectionnées sur l'absence de réparation de l'ADN.

Ayant pris connaissance des propriétés chimiques et biologiques de l'ADN, envisageons la première étape de la cancérogénèse, l'initiation, caractérisée par l'apparition d'une lésion génétique.

II) L'Initiation : Première étape de la Cancérogénèse

1) MECANISMES D'APPARITION DE LA LESION GENETIQUE

Que l'orgine soit physique, chimique ou biologique, elle cause une altération du génôme qui prédispose à l'évolution tumorale.

a) Origine physique

L'exemple est donné par les radiations ionisantes et les rayons ultra-violets. Ces derniers induisent des tumeurs cutanées lorsque les systèmes de protection (mélanine, D-hydro-cholestérol) sont dépassés ou lorsque les systèmes de réparation de l'ADN sont inexistants (xeroderma pigmentosum) (64).

L'action des ultra-violets sur l'ADN est la suivante :

- transformation de la cytosine en uracile par désamination
- hydratation de l'uracile en dihydroxyuracile qui se comporte comme la cytosine
- la thymine peut se dimériser par pontage.

b) Origine chimique

Les agents intervenant dans cette catégorie agissent soit sur la réplication de l'ADN, soit sur l'ADN lui-même.

I modification de la réplication

Les travaux de LOEB indiquent que certains ions affectent l'activité de certaines enzymes qui interviennent pendant la duplication de l'ADN (112). C'est le cas du manganèse , Mn^{2+}, qui induit une perte de spécificité de l'ADN-polymérase. La conséquence est l'incorporation de faux nucléotides.

II modification de la structure

La caractéristique fondamentale des molécules mutagènes est de posséder un site fortement électrophile (62), c'est-à-dire avide d'électrons. De ce point de vue, deux types de molécule se distinguent (112) :

- les cancérogènes directs, ou primaires, pour lesquels le caractère électrophile existe d'emblée,
- les procancérogènes, pour lesquels une transformation métabolique est indispensable pour acquérir ce caractère.

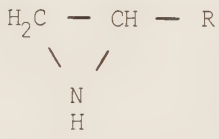
(1) cancérogènes directs

Ils sont classés parmi les agents alkylants, capables de fixer un radical alkyl sur une autre molécule, dont les bases azotées de l'ADN. Ceci conduit à la formation d'un " adduit ", nucléoside déformé par un cancérogène.

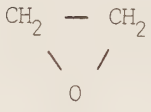
Dans cette catégorie, citons les lactones, les époxydes, les moutardes, les sulfate esters, certains composés halogénés, les nitrosamides et nitrosourées.

EXEMPLES DE CANCEROGENES DIRECTS ou PRIMAIRES (112)

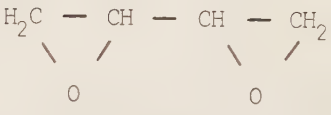
Ethylène imine



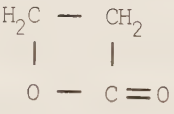
Oxyde d'éthylène



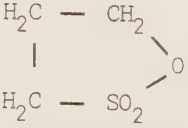
1,2,3,4-butadiène epoxyde



β-propriolactone

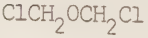


Propane sulfone

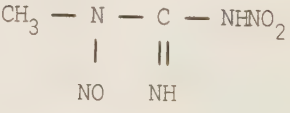


Diméthyl sulfate

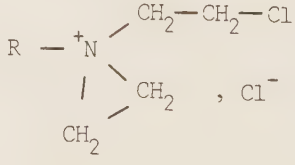
bis(chlorométhyl)ether



N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine



Moutardes



(2) procancérogènes

Pour acquérir un caractère électrophile, un procancérogène doit subir une activation métabolique. Le produit actif obtenu est appelé " cancérogène ultime ".

En ce qui concerne les hydrocarbures polycycliques, le processus de bioactivation passe par la formation d'un diolépoxyde (120). La preuve est fournie par l'étude de l'effet mutagène in vitro du benzo(a) pyrène et de ses métabolites, seul ou en présence d'un homogénat de foie contenant le système microsomal nécessaire (fraction S 9).(cf.p.26)

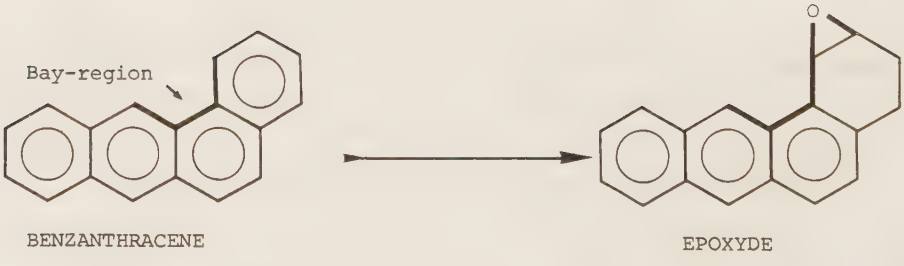
La question est alors de savoir comment se forme le diol-époxyde actif ? Cette transformation ne se fait pas au hasard et répond à la théorie de la " Bay-region " (15). Pour des raisons de structure électronique, cette région est la zone au voisinage de laquelle peut se former un époxyde.(cf.p.26)

En fait, le principal cancérogène ultime actif est l'un des plusieurs stéréoisomères du diolépoxyde obtenu (14). Ce composé instable réagit avec un site nucléophile riche en électrons pour engendrer un complexe covalent.(cf.p.27).

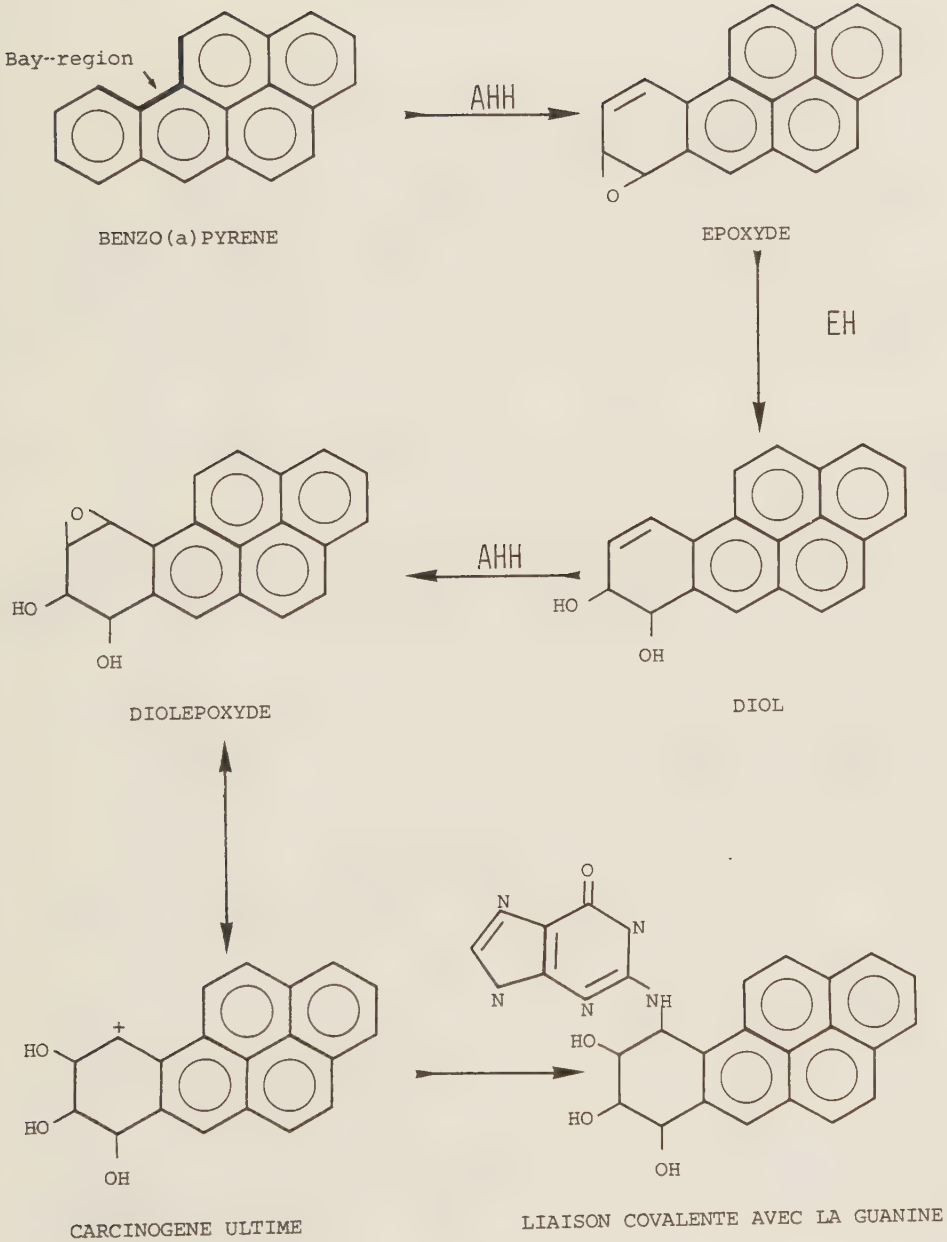
Les autres familles chimiques appartenant à la catégorie des procancérogènes subissent également une activitation métabolique qui conduit à la formation de composés réactifs. Ces procancérogènes, et leur cancérogène ultime respectif, sont les suivants :

- les carbures insaturés ⟶ époxyde
- les amines aromatiques ⟶ ion nitronium
- les nitrosamines ⟶ ion méthonium
- les dérivés halogénés ⟶ radicaux libres.

	EFFET MUTAGÈNE *in vitro* (15)	
	Seul	Avec fragment de foie
benzo(a)pyrène	-	+ effet 1
7,8 diol	-	+ effet 4
7,8 diol 9,10 époxyde	+ effet 100	+ effet 100



THÉORIE DE LA BAY-REGION



BENZO(a)PYRENE

EPOXYDE

DIOLEPOXYDE

DIOL

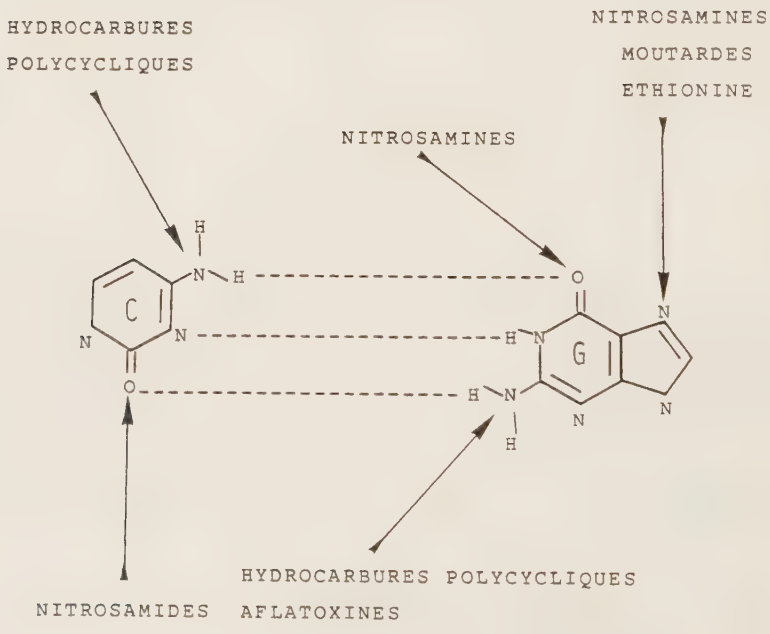
CARCINOGENE ULTIME

LIAISON COVALENTE AVEC LA GUANINE

AHH : Aryl Hydrocarbon Hydroxylase

EH : Epoxid Hydroxylase

Groupements nucléophiles	Localisations
$\rangle S :$	méthionine
$-S :$	cystéine
$\rangle N :$	histidine (N-1;N-3) guanine (N-7) adénine (N-1;N-3) cytidine (N-3)
$\rangle C :$	thyrosine (C-3) guanine (C-8)
$\rangle C : O^-$	guanine (O-6)



Parmi les sites nucléophiles de la cellule, notons les bases azotées de l'ADN, celles de l'ARN et les protéines (méthionine, cystéine, histidine...). Les bases azotées de l'ADN sont les plus dangereuses car leur modification est transmise héréditairement et présente un effet durable. D'autre part, le lieu précis de la fixation covalente n'est pas identique pour toutes les classes chimiques (cf. p.28)

c) Origine biologique

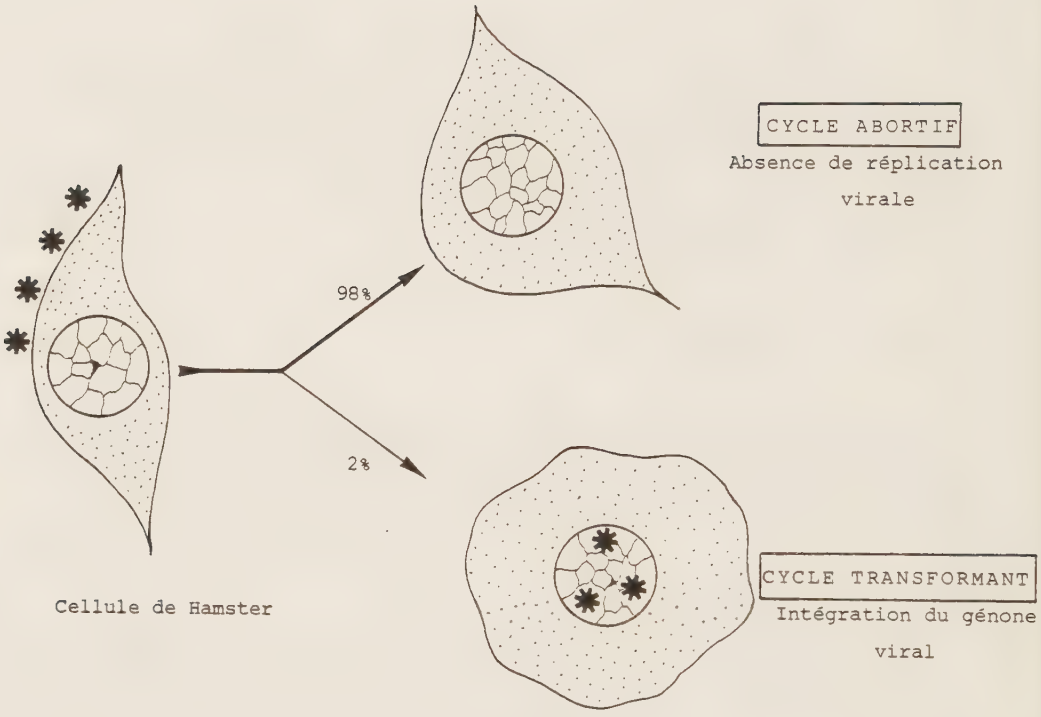
L'étude des virus oncogènes des animaux de laboratoire a permis de démontrer que ces particules biologiques entraînaient une lésion génétique. L'exemple utilisé est le SV 40 (123).

Quarantième virus isolé chez le singe rhésus ; il fut découvert de façon accidentelle car il n'est pas pathogène dans l'espèce d'origine. Par contre, il est sarcomatogène chez le hamster.

Son étude *in vitro* s'est réalisée sur cellules de hamster, dites " non permissives " car elles ne permettent pas la réplication du virus. Dans ce cas, 2 % des cellules initiales deviennent des cellules " transformées " : arrondies, croissance exponentielle et perte d'inhibition de contact. Or ces caractères sont ceux des cellules cancéreuses.

Par différentes méthodes dont l'immunologie, l'hybridation cellulaire et l'hybridation moléculaire, l'intégration du genôme viral dans le génôme des cellules transformées a été démontrée . Cette intégration est synonyme de lésion génétique.

La lésion génétique ainsi induite entraîne des désordres dans la cellule. C'est ce que nous nous proposons d'étudier sous le terme de " conséquences biologiques ".



EFFET DU SV_{40} SUR CELLULE NON PERMISSIVE

2) *CONSEQUENCES BIOLOGIQUES DE LA LESION GENETIQUE*

Les agents responsables d'une lésion génétique sont appelés " genotoxiques " : leur action est mutagène. Dans certains cas, la mutation induite implique l'apparition d'une tumeur. Un agent capable de provoquer le processus de cancérogénèse dans son entier est un " carcinogène complet " (83).

Mais telle n'est pas la règle générale. Certaines molécules, en effet, ne peuvent pas engendrer l'ensemble de ce processus, mais uniquement un stade précoce de cancérogènèse, l'initiation, apparemment irréversible. De tels agents sont des " initiateurs ".

Dans un premier temps, nous envisagerons rapidement les effets d'un carcinogène complet, afin de pouvoir mieux les comparer à ceux d'un initiateur.

a) *Cancérogènes complets*

Ils entraînent l'apparition d'un cancer caractérisé, outre par la multiplication anarchique des cellules, par des modifications cytologiques et biochimiques importantes, mais cependant non spécifiques.

modifications cellulaires

La cellule cancéreuse est histologiquement définie par une basophilie importante et un rapport nucléoplasmique élevé. Ces deux critères, qui sont ceux des cellules jeunes, prouvent que la cellule cancéreuse est le résultat d'une dédifférenciation.

Outre cela, des critères histologiques définissent tous les types de cancer : perte de l'architecture , invasion périphérique, métastases vasculaires, monstruosités nucléaires...

II modifications biochimiques

Les modifications biochimiques sont en relation directe avec la lésion génétique qui perturbe le métabolisme de la cellule cancéreuse.

. l'augmentation de la synthèse des acides nucléiques, ADN et ARN, est mise en évidence par l'incorporation augmentée de thymidine tritiée. Ceci conduit à une protéosynthèse accrue. Une telle augmentation explique le rapport nucléoplasmique élevé de la cellule cancéreuse et sa basophilie.

. la protéosynthèse est également perturbée qualitativement. Dans le cas d'hépatocarcinome, il apparaît une résurgence des protéines oncofoetales. Dans d'autres cas, on note des sécrétions de protéines anormales.

. la diminution d'AMPc permet, dans la mesure où l'AMPc bloque les mitoses, d'expliquer la perte de contrôle des divisions cellulaires.

. les modifications des réactions d'oxydo-réduction font dire que la cellule cancéreuse " fermente plus qu'elle ne respire ".

. des modifications membranaires sont observées. Des changements des glycoprotéines de surface, conduisant à l'apparition de néoantigènes membranaires, sont à l'origine de la perte d'inhibition de contact.

Tous les agents génotoxiques n'entraînent pas la formation directe d'un cancer. L'utilisation des initiateurs conduit à l'apparition d'autres altérations.

b) Initiateurs

L'illustration de la notion d'initiation sera effectuée par l'action du 2-acétylaminofluorène , 2-AAF, sur le foie de rongeurs. Nous envisagerons d'abord les altérations occasionnées par cet initiateur, tant cytologiques (37) que biochimiques. Il conviendra ensuite de prouver que ces lésions sont bien un étape dans la cancérogénèse hépatique.

I critères de diagnose

(1) cytologie

L'observation des lésions hépatiques induites par le 2-AAF à l'aide d'une coloration classique à l'hématoxyline-éosine permet de distinguer quatre types d'hépatocytes altérés :

- cellules claires :elles présentent une accumulation de glycogène, qui est dissout par la technique histologique d'inclusion en paraffine, d'où l'aspect clair de ces cellules. Le glycogène est mis en évidence par la réaction à l'acide périodique de Schiff (PAS positif)
- cellules acidophiles : l'acidophilie est due à une hypertrophie du réticulum endoplasmique lisse, souvent combinée à une accumulation de glycogène
- cellules basophiles : la basophilie est le résultat d'une abondance de ribosomes
- cellules de type intermédiaire : les plus fréquentes présentent un cytoplasme clair et basophile ou acidophile et basophile

(2) topographie

L'hyperplasie, qui a pour définition une augmentation du nombre des cellules, produite par le 2-AAF présente deux images topographiques (4) :

- foyers ou zones d'altérations cellulaires : l'architecture générale est légèrement modifiée par rapport au tissu sain et ces foyers ne compriment pas le parenchyme périphérique. Quand la surface occupée par un foyer d'altérations cellulaires est supérieure à celle du lobule hépatique, il est qualifié de "zone " .
- nodules néoplasiques : ce terme remplace et supprime celui de nodules hyperplasiques. L'architecture interne y est anar-

chique. Dans ce cas, le parenchyme périphérique est comprimé : les travées saines s'aplatissent et se disposent perpendiculairement au diamètre du nodule. Cet aspect traduit la croissance centrifuge du nodule.

Dans les deux cas, on rencontre les différents types cellulaires précédemment décrits .

(3) biochimie

Ces anomalies morphologiques s'accompagnent de modifications biochimiques détectables avant la traduction histologique, telles que :

- présence de gamma glutamyl transpeptidase (GGT) : cette enzyme n'est normalement présente que dans le foie de rat foetal (16,29)
- déficience en glucose 6 phosphatase (87)
- déficience en adénosine triphosphatase (82)
- absence de stockage de fer lors de sidérose hépatique induite (43).

II preuves de l'état pré-tumoral

Les foyers sont les précurseurs histologiques des tumeurs pour plusieurs raisons (109) :

- ils provoquent des anomalies dans la morphologie et le fonctionnement des cellules
- ils sont prolifératifs
- une exposition prolongée conduit à la formation des nodules néoplasiques
- leur incidence dans les différents lobes hépatiques correspond à celle des hépatocarcinomes.

La question est alors de savoir si les nodules néoplasiques sont une étape obligatoire dans la cancérogènèse hépatique. De nombreuses observations morphologiques indiquent que les altérations cellulaires peuvent apparaître sans arrangement nodulaire. Si de tels foyers sont composés de cellules basophiles, il semble raisonnable de les appeler microcarcinomes in situ (4). Cette interprétation est supportée par l'observation de différents auteurs qui indiquent que les foyers basophiles montrent souvent des atypies cellulaires et une augmentation considérable des mitoses.

Ainsi, foyers et nodules sont les deux images histologiques qui signent une initiation et à partir desquelles la transformation maligne peut prendre place, grâce au phénomène de " promotion ". Néanmoins, le nombre de ces lésions régresse rapidement avec l'arrêt du traitement. On parle alors de " récupération".

L'exemple de l'action du 2-AAF sur le foie de rat, n'est pas le seul pour illustrer la notion d'initiation. Le tableau ci-contre cite l'action de plusieurs initiateurs sur différents tissus.

SYSTEMES INITIATION - PROMOTION

Tissu	Initiateur	Promoteur	Référence
EPIDERME DE SOURIS	. 3-méthylcholanthrène	TPA	90
	. benzo(e)pyrène	TPA	89
	. N-hydroxy-1-naphtylamine	résine de croton	68
	. N-acetoxy-2-acétamido phénanthrène	TPA	91
	. β-propriolactone	huile de croton	20
	. N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	huile de croton	13
	. Uréthane	huile de croton	41
EPIDERME DE RAT	. Radiation β	fumée de cigarette	58
VESSIE DE RAT	. Méthylnitrosourée	saccharine	42
FOIE DE RAT	. 2-AAF	phénobarbital	77
		DDT	77
	. Diéthylnitrosamine	phénobarbital	111
GLANDE MAMMAIRE DE RAT	. 7,12-diméthylbenzantracène	phorbol	2
POUMON DE SOURIS	. Uréthane	butylhydroxy-toluène	119
COLON DE RAT	. N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	acide litho-cholique	89

AUTRES INITIATEURS	AUTRES PROMOTEURS
. Nombreux hydrocarbures . 7-bromomethyl-benz(a)anthracène substitué (24) . Epoxydes alkyls (107)	. Esters de phorbol (40) . Cyclamate (42) . Phénol et dérivés (12) . Anthralin (11) . Détergents non ioniques (94) . Acide iodoacétique (39) . Hydrocarbures aliphatiques(96)

III) La Promotion, deuxieme Etape de la Cancerogénèse

I) FACTEURS EPIGENETIQUES

La démonstration de ce phénomène dans les laboratoires de ROUS et BERENBLUM et SHUBIK donna raison au concept de cancérogénèse en deux étapes : initiation et promotion. Cette dernière est le fruit des facteurs épigénétiques (7,8,67).

a) Mise en évidence

L'application simultanée d'un hydrocarbure polycyclique et d'huile de croton (*Croton tiglium L.*)sur la peau de souris entraîne un taux de sarcomes bien supérieur à celui des animaux témoins sur lesquels n'a été appliqué que l'hydrocarbure polycyclique. Cette expérience conduit à la notion de " cocancérogénèse ".

Il est également possible d'obtenir des sarcomes en badigeonnant la peau de souris d'abord à l'aide d'un hydrocarbure polycyclique, puis, dans un deuxième temps, d'huile de croton. Cet exemple nous amène à la notion de " promotion ".

b) Définitions

I cocarcinogènes

Un cocarcinogène est un agent qui augmente la carcinogénicité d'un carcinogène complet quand ces deux produits sont administrés simultanément.

Citons, par exemple, les noyaux pyrène et catechol, et l'huile de croton dont les principes actifs sont les esters de phorbol. Ces derniers sont aussi des promoteurs.

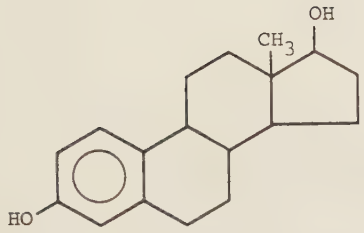
II promoteurs

Un promoteur est un agent capable d'induire le phénomène de cancérogénèse uniquement lorsqu'il y a déjà eu au préalable initiation. A l'inverse de l'huile de croton, tous les cocarcinogènes ne sont pas des promoteurs, et réciproquement.

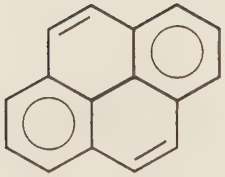
La saccharine, le diethylstilbestrol, l'oestradiol, le tryptophane et le phénobarbital sont des exemples de promoteurs.

Si les facteurs épigénétiques interviennent de façon primordiale dans la cancérogénèse, cocarcinogènes et promoteurs ne sont pas pour autant eux-mêmes des cancérogènes.

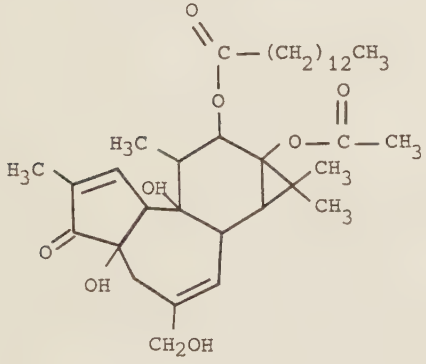
Une question importante sur la nature de la promotion se pose : la promotion consiste-t-elle en l'évolution d'une cellule tumorale ou en l'évolution vers une cellule tumorale ? Il semblerait que la réalité soit l'association de ces deux possibilités.



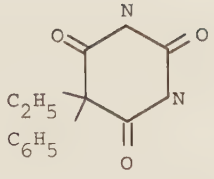
OESTRADIOL (P)



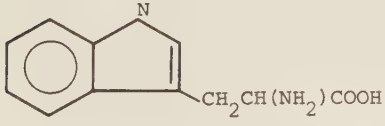
PYRENE (CC)



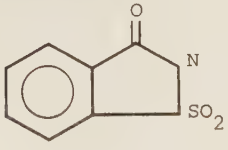
ESTER de PHORBOL (CC,P)



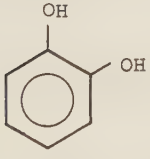
PHENOBARBITAL (P)



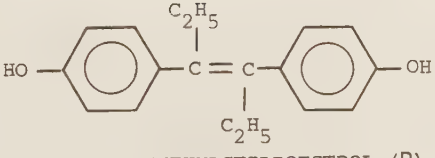
TRYPTOPHANE (P)



SACCHARINE (P)



CATECHOL (CC)



DIETHYLSTILBOESTROL (P)

COCARCINOGENES (CC) ET PROMOTEURS (P)

II) PROPRIETES ET EFFETS DES PROMOTEURS

Dans la mesure où initiateurs et promoteurs sont associés dans le concept de cancérogénèse en deux étapes, envisageons les propriétés comparées de chacun (70).

a) Comparaison initiateurs-promoteurs

/ initiateurs

- Ils sont cancérogènes par eux-mêmes
- Une seule exposition suffit pour l'initiation
- L'initiation est rapide et irréversible
- Il ne semble pas qu'une dose seuil soit nécessaire pour que l'initiateur provoque son effet
- L'administration de deux initiateurs ou la répétition de petites doses sont additives
- Les initiateurs sont, directement ou après bioactivation, des composés électrophiles qui se lient de façon covalente aux macromolécules
- Ils sont mutagènes.

// promoteurs

- Ils ne sont pas cancérogènes sans initiation préalable
- Administrés après un initiateur, ils facilitent la formation de cancer = augmentation du nombre de tumeurs et diminution du temps d'apparition des tumeurs
- Leur action nécessite une exposition prolongée; elle est réversible (au moins au début) et non additive
- Leur action ne requièrt pas de liaison covalente
- Ils ne sont pas mutagènes.

b) Effets d'un promoteur in vitro

Dans la série des esters de phorbol issus de l'huile de croton, le promoteur le plus puissant est le 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acétate, TPA. Le mécanisme d'action intime des promoteurs n'est pas connu, mais il semble certain que l'activité de ces agents ne nécessite pas d'activation métabolique.

/ effets biochimiques

Après quelques minutes à quelques heures d'exposition des cellules en culture au TPA, des modifications membranaires apparaissent . Elles peuvent être le résultat d'une perturbation du métabolisme des phospholipides, des glycoprotéines de membrane, de l'expression des protéines LETS (large-external-transformation-sensitive).

Les promoteurs affectent également certaines synthèses: prostaglandines, polyamines, acides nucléiques et protéines.

Enfin, ils inhibent la " coopération métabolique " qui est un échange de molécules entre cellules,in vivo ou in vitro.

// effets biologiques

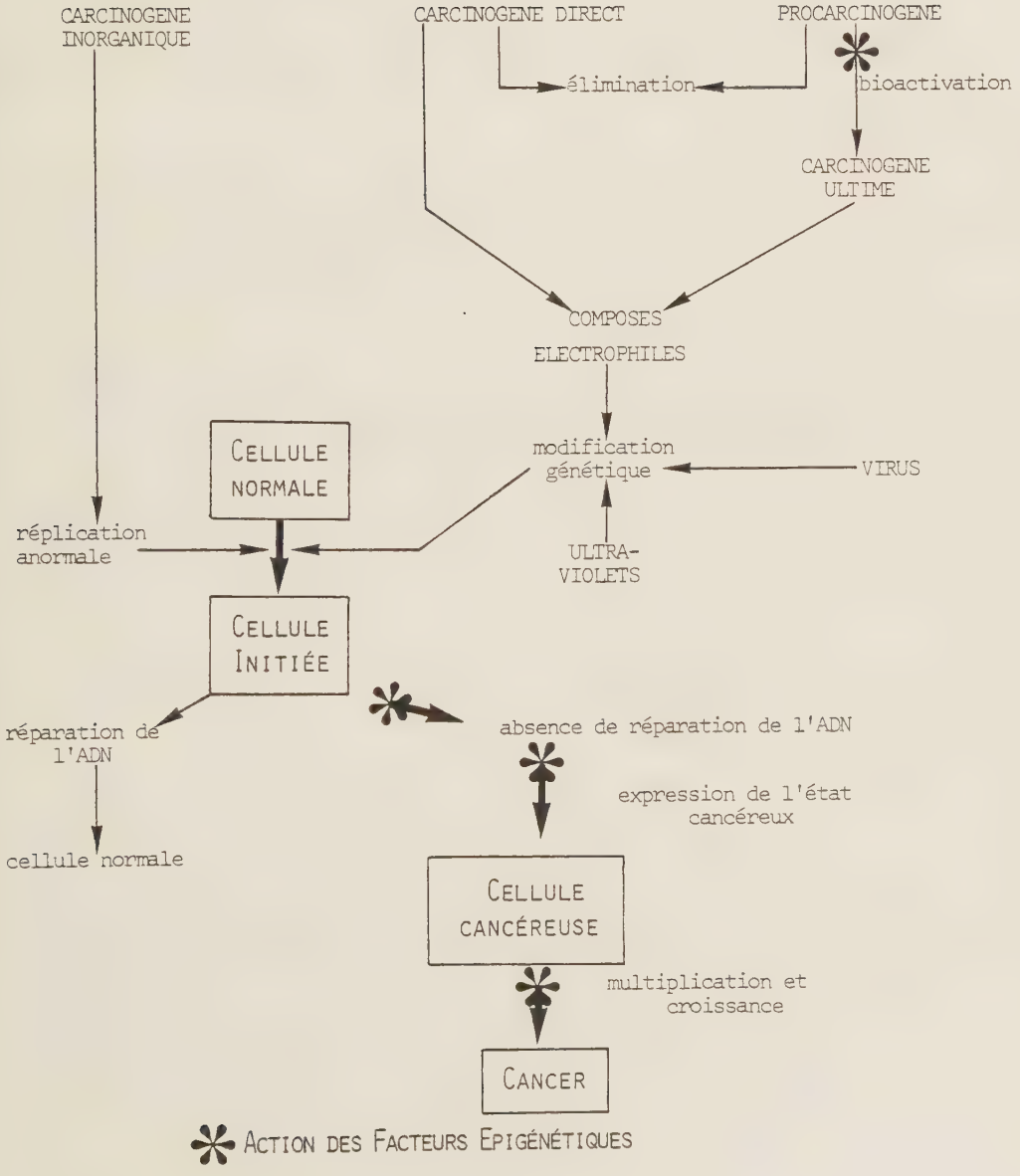
D'une façon générale, les promoteurs facilitent l'expression des mutations, inhibent la différenciation cellulaire et augmentent le pourcentage de la transformation maligne.

III) MECANISME D'ACTION DES PROMOTEURS

Le mécanisme d'action exact n'est pas élucidé, mais il semblerait qu'un promoteur agisse comme une hormone par l'intermédiaire de récepteurs cellulaires et de messagers secondaires à l'origine d'altérations de l'expression génique.

EFFETS DES ESTERS DE PHORBOL SUR DES CELLULES in vitro

Effets biochimiques	Réponse	Référence
. Entrée de petites molécules		
- ions	augmentée	113
- sucres	augmentée	25
- thymidine	diminuée	
. Synthèse des prostaglandines	augmentée	56
. Métabolisme des phospholipides	augmenté	101
. Glycoprotéines de membrane	altérées	110
. Synthèse des polyamines	augmentée	72
. Synthèse d'ARN	augmentée	78
. Synthèse d'ADN		
- précoce	retardée	125
- tardive	augmentée	78
. Production d'activateur du plasminogène	augmentée	114,115
. Protéines LETS	diminuées	10
Effets biologiques		
. Morphologie cellulaire	altérée	25,125
. Division cellulaire	augmentée	25, 22
. Expression des mutations	augmentée	105,49
. Différenciation terminale	inhibée	22
. Synthèse d'Herpès virus	augmentée	126
. Transformation maligne	augmentée	65,50


CARCINOGENE INORGANIQUE
CARCINOGENE DIRECT
PROCARCINOGENE
élimination
bioactivation
CARCINOGENE ULTIME
COMPOSES ELECTROPHILES
CELLULE NORMALE
modification génétique
VIRUS
réplication anormale
ULTRA-VIOLETS
CELLULE INITIÉE
réparation de l'ADN
absence de réparation de l'ADN
expression de l'état cancéreux
cellule normale
CELLULE CANCÉREUSE
multiplication et croissance
CANCER
ACTION DES FACTEURS EPIGÉNÉTIQUES

Le promoteur induirait donc une dérepression génique et, par voie de conséquence, la transformation maligne, à l'instar d'un virus qui, insensible au gène représseur , exerce son action oncogène (112).

Cette hypothèse présente l'avantage d'expliquer la réversibilité du phénomène.

En conclusion, un initiateur entraîne une lésion de l'ADN et un promoteur permet à cette lésion de s'extérioriser. Néanmoins, cette extériorisation entre en compétition avec le système de réparation de l'ADN : celui-ci peut supprimer la lésion avant son extériorisation ou être saturé.

Le système initiateur-promoteur est donc un système dynamique qui résulte d'une lutte continue entre des agents destructeurs et des mécanismes réparateurs. La victoire d'un destructeur est aggravée par la présence d'un promoteur, dont le mécanisme d'action reste imparfaitement connu. Cette dynamique prouve la difficulté de trouver un modèle expérimental rendant compte de la complexité et peut être de la pluralité des mécanismes.

Cette premiere partie a permis de présenter le système initiateur-promoteur, principe de base de la cancérogénèse en deux étapes, dont la connaissance présente plusieurs intérêts:

- épidémiologie du cancer : la haute fréquence de cancer de l'oesophage dans l'île de Curaçao, expliquée par l'utilisation de thé fabriqué à partir de *Croton flavens*, en est un exemple (70).
- prévention anti-cancéreuse : des inhibiteurs de la cancérogénèse sont connus : rétinoïdes, anti-oxydants, stéroïdes anti-inflammatoires.
- détection des molécules cancérogènes : la mise en place d'épreuves biologiques permet de démasquer l'effet cancérogène de médicaments avant la mise sur le marché. La présentation de ces tests fera l'objet de la deuxième partie.

Deuxième Partie

PRESENTATION DES TESTS DE CANCEROGENESE

Afin d'obtenir l'Autorisation de Mise sur le Marché, AMM, pour un médicament, une étude de carcinogénèse est rendue obligatoire par la législation dans certains cas précis (73) :

1) si le temps d'administration prévu chez l'homme est d'au moins 26 semaines par an, de façon continue ou discontinue

2) si le produit présente une structure chimique proche d'un cancérogène connu

3) si le produit possède une action biologique proche d'un cancérogène connu

4) si le produit a tendance à s'accumuler dans l'organisme (donnée issue de l'étude de la toxicité chronique)

5) si les tests de mutagénèse sont positifs dans l'ensemble.

Les différentes épreuves mises à la disposition du toxicologue appartiennent à trois grands groupes :

1) Les tests à long terme

Ils consistent en l'administration continue de la molécule pendant un temps à peu près égal à la durée de vie de l'espèce animale utilisée. L'expérimentation est ponctuée par une autopsie et de nombreux prélèvements visant à rechercher d'éventuelles tumeurs.

2) Les tests à court terme

Encore appelés tests de mutagénèse, ils ont pour but de déceler, dans un laps de temps assez court, une éventuelle action mutagène.

3) Les tests à moyen terme

Nés de la dernière heure, leur avantage réside essentiellement dans la détection des facteurs épigénétiques.

Le chapitre précédent a montré que le mode d'action des molécules cancérogènes est très variable. Il apparaît donc évident qu'une molécule devra subir plusieurs tests successifs afin de fermer progressivement le verrou de sécurité. Cette deuxième partie a pour but la présentation des tests de cancérogénèse.

I) Les Tests de Cancérogénèse a long terme

Ces tests, les premiers apparus, mettent en évidence d'éventuelles tumeurs sur des organismes entiers, histologiquement décelables et présentant une fréquence significative par rapport aux animaux témoins non traités (121) :

- augmentation de l'incidence des types de tumeurs observées par rapport aux animaux témoins,
- apparition plus précoce des tumeurs par rapport aux animaux témoins,
- développement de tumeurs non observées chez les témoins,
- augmentation de la multiplicité des tumeurs chez l'animal individuel.

I) ESPECES ET SOUCHES ANIMALES UTILISEES

Les études de cancérogénèse sont obligatoirement réalisées sur deux espèces animales. On utilise de préférence des animaux dont le métabolisme, pour la molécule considérée, est le plus proche possible de celui de l'homme.

Au préalable, il sera important de savoir comment les animaux utilisés répondent à des produits chimiquement proches de celui testé. Les espèces et souches à haute probabilité de tumeurs spontanées seront évitées autant que possible. Ces différents impératifs signent l'inexistence d'espèces et de souches animales idéales.

Classiquement, le rat et la souris ou le hamster sont les espèces les plus utilisées. Les souches panmictiques sont recommandées mais leur fréquence de tumeurs spontanées est élevée (perte de 22% des animaux à 18 mois). Les animaux consanguins peuvent être préconisés car leurs caractères sont mieux fixés.

Ainsi, le rat et la souris sont essentiellement utilisés car :

- leur durée de vie est courte : souris = 2 ans
  rat = 3 ans
- il est possible d'obtenir des lots d'animaux en grande quantité, ce qui est important pour l'analyse statistique de l'étude, et génétiquement homogènes
- les fréquences et caractéristiques des différents types de tumeurs pour chaque souche sont connues

D'autres espèces animales, le chien et le singe, ne sont pas retenues du fait de leur trop longue durée de vie.

II) DOSES ADMINISTREES

a) Voie et fréquence d'administration

Tant que faire se peut, la voie d'administration du produit sera celle prévue en thérapeutique chez l'homme. Il sera alors nécessaire de démontrer l'absorption du produit dans les conditions de l'expérimentation par mesure des taux sanguins du produit tous les six mois par exemple .

Exception est faite de l'absorption cutanée : toutes les espèces animales ne sont pas aussi sensibles. Par voie de décroissance, citons : le lapin, le cobaye, le rat, le primate et l'homme.

La fréquence d'administration sera calquée sur celle prévue chez l'homme : une fois par jour le plus souvent.

b) Doses

Les animaux sont classés en quatre lots : selon la posologie un lot témoin non traité, un lot à faible dose, un lot à moyenne dose et un lot à forte dose.

Le choix de la posologie est délicat dans la mesure où l'épreuve recherche une action cancérogène et non une action toxique.

&) choix de la forte dose

Elle correspond à la dose maximale tolérée, DMT, dose qui ne provoque pas une perte de poids de plus de 10% après 90 jours d'administration. Ceci permet d'éviter :

- une dose trop toxique qui entraînerait la mort des animaux avant l'apparition de tumeurs,
- une cancérogénèse secondaire (les anti-thyroïdiens à forte dose provoquent une hyperplasie de la thyroïde)

&&) choix de la faible dose

Elle est de deux à trois fois la dose thérapeutique prévue chez l'homme.

&&&) choix de la dose moyenne

Elle résulte de la moyenne géométrique des deux précédentes .

III) CARACTERISTIQUES PRATIQUES

Les animaux doivent être en bonne santé dès le début de l'étude et pendant toute sa durée, et placés dans une animalerie répondant à des normes définies (Good laboratory practice. GLP)

Des précautions sont prises pour éviter les risques de dispersion du produit dans le milieu, en particulier, lors des études par inhalation : une séparation des différentes études en cours, des lots traités et témoins sera effectuée d'une façon stricte.

a) Age des animaux

Les études de cancérogénèse débutent dès que possible après le sevrage et après l'adaptation des animaux à l'environnement et à l'alimentation, soit vers l'âge de 6 semaines.

b) Durée des études

La pratique recommandée est de conduire ces études pendant 24mois chez le rat et 18 mois chez la souris et le hamster. L'utilisation du chien (Beagle) nécessite 4 ans et le singe 7 ans.

c) Nombre d'animaux par lots

En routine, il est suggéré de compter, pour chaque sexe, cinquante animaux par lots. Il est préférable néanmoins d'utiliser deux lots témoins qui seront traités avec le solvant de la molécule testée ; le lot forte dose sera doublé.

	Mâle	Femelle	
T_1	50	50	
T_2	50	50	
I	50	50	pour une espèce animale
II	50	50	
III	100	100	
Total	600 animaux		

d) Composition de l'aliment

Les aliments du commerce ont l'avantage d'apporter une alimentation homogène pendant toute la durée de l'étude. La formule devra être connue dans son intégralité et la recherche de différents agents toxiques sera effectuée (aflatoxines, nitrosamines...)

Quelques précautions sont à prendre dans le cas où la molécule testée est administrée per os dans l'aliment ou dans la boisson: un certificat doit être réclamé à propos de la stabilité de la molécule à l'état pur d'une part, la concentration du principe actif dans l'aliment et l'homogénéité de ce mélange seront vérifiées par trois prises d'échantillon (début , milieu et fin de mélange) d'autre part.

IV) ETUDE COMPLEMENTAIRE

Aucune étude complémentaire, apportant de nouvelles données, ne sera entreprise sur les mêmes animaux, si elle porte préjudice à l'évaluation du potentiel carcinogène du produit. Ainsi, les informations portant sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination du produit seront récoltées à partir d'autres études toxicologiques. De même ,

afin de ne pas interférer avec l'expérimentation, les taux sanguins du principe actif seront obtenus à la suite du sacrifice de quelques animaux tous les six mois.

V) CONCEPTION STATISTIQUE DE L'ETUDE

Le principe de base est d'éviter tout biais expérimental induit par les facteurs de l'environnement :

- la disposition des cages d'un même lot est verticale
- la formation des lots résulte d'un tirage au sort des animaux (randomisation)
- chaque cage ne doit pas renfermer plus de quatre animaux.

En effet, les animaux isolés présentent des réactions aux stimuli expérimentaux différentes de celles des animaux en groupe. La fréquence, et même le type de tumeur, diffèrent chez les animaux isolés ou groupés.

VI) EXAMENS TERMINAUX

a) Autopsie

Tout animal mort durant l'étude ou sacrifié en fin d'étude est l'objet d'une autopsie complète. Des examens biochimiques et hématologiques sont réalisables : les résultats permettront éventuellement l'interprétation des lésions observées.

b) Histopathologie

- l'examen histopathologique porte obligatoirement sur les lots témoins et forte dose
- il s'effectue également sur toutes les lésions macroscopiques quelque soit l'animal, et le lot auquel il appartient,

LISTE DES TISSUS PRELEVES POUR UN EXAMEN HISTOPATHOLOGIQUE

- lésions macroscopiques,
- tumeurs, en incluant le(s) ganglion(s) lymphatique(s) de drainage
- ganglion mandibulaire,
- glandes mammaires,
- glandes salivaires,
- sternèbre, fémur ou vertèbre, en incluant la moelle osseuse,
- glande pituitaire,
- thymus,
- trachée,
- poumons,
- coeur,
- thyroïdes,
- oesophage,
- estomac,
- duodénum,
- jéjunum,
- iléon,
- colon,
- foie,
- vésicule biliaire,
- pancréas,
- rate,
- reins,
- surrénales,
- vessie,
- prostate,
- testicules,
- ovaires,
- utérus,
- cerveau,
- yeux,
- moelle épinière.

. il comprend l'observation des lots à faible et moyenne dose si des tumeurs apparaissent dans le lot à forte dose
. tous les animaux morts ou sacrifiés pendant l'étude seront soumis à un examen histopathologique.

VII) ETABLISSEMENT DES RAPPORTS

Les résultats sont présentés séparément pour chaque lot et chaque sexe. Ils visent à mettre en relief :

. le nombre d'animaux examinés et leur résultat macroscopique et microscopique
. le nombre d'animaux, et le pourcentage, présentant des tumeurs, en distinguant tumeurs malignes et tumeurs bénignes
. la distribution du nombre total de tumeurs observées
. la durée de vie des animaux
. le moment d'apparition de toute " grosseur " cliniquement palpable, son évolution et son observation histologique.

VIII) ANALYSE DES DONNEES

Les réponses sont réparties dans les différentes catégories suivantes :

. incidence totale des animaux porteurs de tumeurs
. incidence totale des tumeurs
. incidence des tumeurs par tissu
. incidence des tumeurs jugées malignes
. période de latence des tumeurs.

Les analyses ont pour but de :

. déterminer l'existence ou non d'une action du produit et d'une éventuelle relation effet-dose, en étudiant le contraste des réponses des lots traités et témoins.

. déceler une éventuelle influence de causes étrangères susceptibles de modifier les résultats.

Le protocole ainsi présenté est applicable pour l'obtention d'une AMM dans la Communauté Economique Européenne (17). Aux Etats-Unis, les données du National Cancer Institute font force de loi (38) et définissent un protocole proche, à quelques détails près.

II) Les Tests de Mutagénèse

La connaissance de la corrélation plus ou moins étroite entre mutagénèse et cancérogénèse a conduit à la mise au point et à l'utilisation, ces dernières années, de tests de mutagénèse.Ce chapitre est très vaste de par la multiplicité des substrats biologiques utilisables et des principes de base conduisant à révéler une mutation. Les substrats varient de la bactérie aux mammifères, en passant par les champignons et les insectes. Les principes de base s'étendent de la mutation ponctuelle à la cassure chromosomique. La présentation proposée des tests de mutagénèse est basée sur le substrat biologique utilisé.

I) MICROORGANISMES PROCARYOTES ET PHAGES

a) Bactéries

&) test de Ames

Le test le plus utilisé ayant pour substrat des bactéries est le test de Ames, sur Salmonella.

(1) souches utilisées

Les souches utilisées appartiennent à l'espèce *Salmonella typhi murium* et présentent quelques caractéristiques (1) :

. leur milieu de culture doit contenir de l'histidine qu'elles ne peuvent synthétiser; elles sont donc dépendantes vis-à-vis de l'histidine = souches his (-)
. leur système de réparation de l'ADN est inexistant ; une mutation ne sera donc pas réparée = souches uvr
. la diffusion de grandes molécules est facilitée par une mutation supplémentaire intervenant sur la perméabilité membranaire = souches rfa

Ces souches ont pour nom TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 et TA 1538.

(2) principe de base

Le principe consiste à étudier la mutation réverse his(-) à his (+), c'est-à-dire le retour au caractère sauvage , avec ou sans activation métabolique, sous l'action de la molécule testée. Le milieu de culture ne contient pas d'histidine. Ainsi, seules les bactéries ayant subi la mutation réverse engendrent l'apparition de colonies.

&&) autres tests

(1) bactéries utilisées

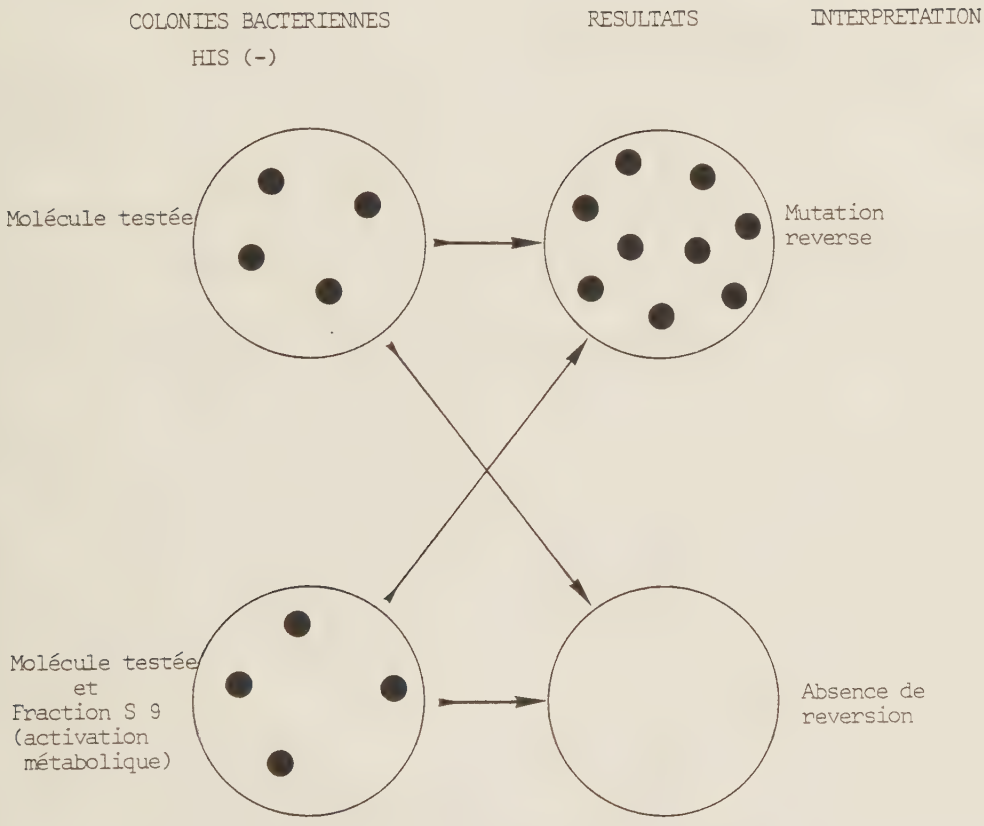
Outre *Salmonella typhi murium* d'autres bactéries servent de substrat biologique

. *Escherichia coli* =

E.coli B/r WP-2 : auxotrophe vis-à-vis du tryptophane (36)
E.coli K-12 ( ) : elle présente trois facteurs limitants qui sont le galactose, l'acide nicotinique et l'arginine (63)

. *Bacillus subtilus* =

les mutants qui ne sporulent pas sont caractérisés par la perte de la coloration brune (102)


COLONIES BACTERIENNES
HIS (-)
RESULTATS
INTERPRETATION
Molécule testée
Mutation reverse
Molécule testée et Fraction S 9 (activation métabolique)
Absence de reversion

TEST DE AMES

(2) principes de base

. mutation reverse : son principe est identique à celui du test de Ames. La bactérie utilisée est *E.coli*. La mise en évidence peut se faire à l'aide d'un test dit de " fluctuation" (36')

. mutation directe = un exemple est le test de sporulation avec *B.subtilis*.

. inhibition de croissance différentielle = de nombreux agents mutagènes présentent un pouvoir létal supérieur envers les souches déficientes en système de réparation de l'ADN. Ce caractère est mis à profit pour comparer, sous l'action d'une molécule testée, le degré d'inhibition de croissance entre le type sauvage et le type mutant déficient. Ce test est réalisé en suspension de culture ou sur boîtes de Pétri au centre desquelles la molécule testée est placée dans une encoche ou sur un disque de papier (97).

b) Phages

&) induction biochimique

Le test utilise *E.coli*, souche BR 513, porteuse d'un bactériophage lambda (λ) qui possède une partie de l'opéron lactose, le gène lac z, Celui-ci est responsable de la formation d'un enzyme, la β-galactosidase, intervenant dans le métabolisme du lactose. Si la molécule testée est mutagène, elle induit la production de β-galactosidase rendant possible l'utilisation du galactose. Ce test est rapide, simple et efficace (26).

&&) inductest

Une bactérie lysogène est une bactérie qui contient un bactériophage latent non pathogène, appelé prophage. C'est le cas de *E.coli* K-12 (λ). Sous l'action d'agents mutagènes, le prophage recouvre sa

virulence et produit la lyse de la bactérie (66).

L'inductest utilise ce principe : l'effet mutagène de la molécule est révélé par l'apparition de centres infectés sur un tapis de bactéries indicatrices non lysogènes.

II) MICROORGANISMES EUCARYOTES

Le principal avantage des microorganismes eucaryotes, par rapport aux procaryotes, est de pouvoir examiner certains effets mutagènes sur les chromosomes de cellules haploïdes ou diploïdes :crossing-over et non-disjonction mitotiques essentiellement.

a) Levures

Les plus utilisées sont *Saccharomyces cerevisiae* (127) et, dans une moindre mesure, *Schizosaccharomyces pombe*(57). Différentes souches permettent de détecter des modifications chromosomiques ou des mutations ponctuelles révélées par un changement de couleur de la colonie ou la perte d'un facteur limitant.

b) Champignons

&) *Aspergillus nidulans*

Les souches haploïdes mettent en évidence des mutations ponctuelles, directes ou reverses, alors que l'état diploïde permet de révéler des anomalies chromosomiques.

. crossing-over et non-disjonction à la mitose : les souches diploïdes hétérozygotes P et P_1 (9) ne poussent pas sur un milieu contenant de la p-fluorophenylalanine si l'un des deux évènements n'est pas apparu. Ainsi, une molécule mutagène entraîne la résistance à la p-fluorophenylaniline. La

culture du champignon révèle donc le remaniement chromosomique. Il est possible de distinguer laquelle des deux possibilités a induit la résistance = une couleur vert pâle révèle le crossing-over et une couleur vert sombre la non-disjonction.

- mutation ponctuelle = elle est révélée par la souche haploïde 35 avec, pour principe, la résistance à la 8-azaguanine.

&&) *Neurospora crassa*

Neurospora crassa existe surtout sous sa forme haploïde : crossing-over et non-disjonction mitotiques ne sont donc pas détectables. Néanmoins, ce champignon peut fonctionner génétiquement comme un élément diploïde par la formation d'hétérocaryons (cellules pseudodiploïdes) utilisables pour détecter des mutations directes.

- mutation directe = une mutation sur les loci ad 3A et 3 B entraîne l'accumulation d'un pigment pourpre
- mutation reverse = elle utilise les mutants des souches N 23 ou N 24 dépendants vis-à-vis de l'adénine. La réversion conduit au retour du caractère sauvage (75).
- non-disjonction méiotique = elle est établie sur des ascopores disomiques. La mutation est révélée par la perte de facteurs limitants.

III) INSECTES

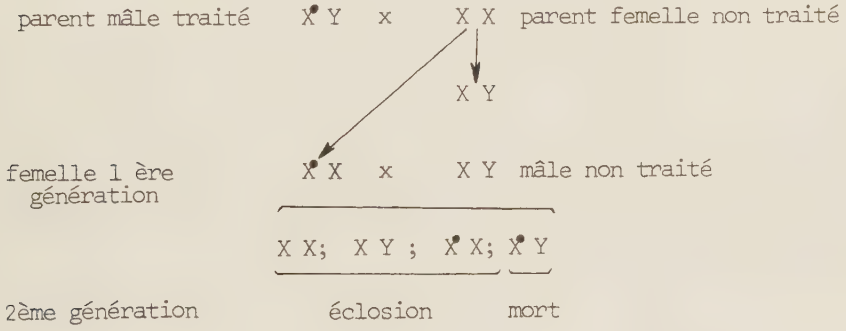
a) Drosophile

Drosophila melanogaster est l'insecte le plus utilisé par les généticiens. La principale épreuve permettant la détection d'un agent mutagène

est le test létal récessif lié au sexe (sex-linked recessive lethal test, SLRL test) (122).

Le principe est de détecter une modification létale du chromosome X qui n'apparaît que chez les mâles car elle est récessive. Le caractère létal s'exprime par l'incapacité des oeufs mâles à éclore.

Dans un premier temps, il convient de traiter des parents mâles avec la molécule testée, puis de les accoupler avec des femelles non traitées. Les femelles de première génération sont alors accouplées avec des mâles non traités. Si la molécule est mutagène, 50 % des oeufs mâles de deuxième génération ne pourront pas éclore.



X = chromosome sain

X* = chromosome létal

b) Autres insectes

L'utilisation de la guêpe pour détecter une mutation létale est rare, tout comme le ver à soie dont les mutants présentent un changement de couleur des oeufs.

IV) CULTURES DE CELLULES DE MAMMIFERES

Ces derniers sont indispensables dans la mesure où ils sont complémentaires des tests ayant pour substrat les procaryotes et les microorganismes eucaryotes. Nous envisagerons successivement les tests de mutagénèse proprement dits, les tests mesurant la réparation de l'ADN et l'inhibition de la réplication, et les tests de transformation.

a) Tests de mutagénèse

ℵ loci mis en cause

(1) loci hypoxanthineguanine phosphoribosyl transferase (H G PRT) et thymidine kinase (TK)

Une cellule de type sauvage, HG PRT $^{+}$, est sensible aux analogues des purines (8-azaguanine ou 6-thioguanine) car ceux-ci sont phosphorylés par l'hypoxanthineguanine phosphoribosyl transférase, et le métabolite obtenu est létal pour la cellule : soit qu'il s'incorpore à l'ADN, soit qu'il inhibe une enzyme vitale. Ainsi, une molécule mutagène transforme le type sauvage en type mutant, H GPRT^{-}, qui, ne synthétisant pas la H GPRTase, est insensible aux analogues des purines.

Il en est de même avec le locus TK, vis-à-vis des analogues des pyrimidines (bromouracile ou trifluorothymidine).

Le locus H GPRT est lié au chromosome X alors que le locus TK est autosomal.

(2) locus adenoside triphosphate (ATPase)

L'ouabaïne est un produit qui inhibe la pompe à sodium de la membrane cellulaire. Or, celle-ci est sous la dépendance d'une enzyme, l'ATPase. Ainsi, une modification du locus autosomal responsable de la fabrication de cette enzyme peut altérer sa sensibilité à l'ouabaïne. Le type mutant est donc ouabaïno-résistant. La fréquence des mutations spontanées induisant une

résistance à l'ouabaïne est plus faible que celle des loci H GPRT et TK.

(3) autres loci

L'isolement de mutants utilise d'autres loci responsables de :

- l'auxotrophie vis-à-vis d'acides aminés
- la thermo-sensibilité
- l'utilisation d'adénoside monophosphate cyclique, AMPc, dibutyryl.

&&) cellules utilisées

(1) cellules de rongeurs de première explantation

Il s'agit de cellules d'embryon de hamster syrien permettant la détection de mutations ponctuelles sur les loci H GPRT et ATP (5).

(2) cellules de lignées de rongeurs

a) cellules de hamster chinois V 79

La fréquence de réversion spontanée est stable = 10^{-5} pour le test H GPRT et 10^{-6} pour le test de résistance à l'ouabaïne (45). Les mutants sont bien caractérisés : les résistants à la 8-azaguanine sont dénués d'activité H GPRTase et les résistants à l'ouabaïne sont phénotypiquement stables. Les cellules V79 ne sont pas capables d'activation métabolique, ceci est vrai pour la plupart des cellules de lignées.

b) cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO)

Elles sont essentiellement utilisées dans le système H GPRT, pour lequel la fréquence de réversion spontanée est stable et de l'ordre de 1-5. 10^{-6}(74).

c) cellules de lymphome de souris (L 5178 Y)

Elles présentent un temps de réplication assez court (11 heures) et peuvent être cultivées en suspension dans un milieu liquide. Ces cellules ont d'abord servi de substrat dans le système TK, pour lequel la fréquence de réversion spontanée est faible et stable, de l'ordre de 10^{-6}. Les mutants sélectionnés montrent une thymidine kinase altérée et sans aucune activité enzymatique (19).

D'autres loci permettent l'utilisation de cette lignée = H GPRT, résistance à l'ouabaïne, dépendance vis-à-vis de l'alanine ou l'asparagine, résistance aux analogues de l'AMPc.

d) hépatocytes de rat adulte

Le locus H GPRT présente une fréquence de réversion spontanée plus élevée que celle des autres types cellulaires, de l'ordre de 10^{-4}. Les mutants résistant à la 8-azaguanine sont stables et ne possèdent pas d'activité H GPRTase (117). Ce type cellulaire présente une activitation métabolique " naturelle " , à la différence des cellules pré-citées.

(3) cellules humaines

a) fibroblastes normaux

Prélevés par biopsies cutanées, ils présentent l'énorme inconvénient d'être hétérogènes, peu stables et d'avoir un temps de vie de culture limité. Le locus cible est le h GPRT (47).

b) fibroblastes de *Xeroderma pigmentosum*, XP

Caractérisés par une déficience en système de réparation de l'ADN, ils sont deux à cinq fois plus sensibles que les précédents pour le même locus cible (59). Ceci illustre ainsi l'importance du système de réparation de l'ADN dans l'extériorisation de l'action d'une substance mutagène.

c) lymphoblastes

La fréquence de réversion spontanée sur le locus H GPRT est semblable à celle des autres lignées, mais le temps nécessaire à l'expression de la mutation est en général plus long (103).

b) Tests mesurant la réparation ou l'inhibition de la réplication de l'ADN

La réparation de l'ADN est induite lorsque des agents mutagènes lèsent le matériel génétique . Ce processus comprend l'excision de la région atteinte et son remplacement . Puisque le rôle de la réparation est

de diminuer les effets mutagènes, les cellules dont ce système est déficient sont plus sensibles aux agents génotoxiques.

&) Mesure de la réparation de l'ADN

Elle est réalisée soit in vitro à l'aide d'une grande variété de cellules humaines ou de rongeurs, soit in vivo sur des tissus de type germinal ou somatique. Les cellules sont exposées à la molécule testée en présence d'un nucléoside radioactif, la thymidine tritiée, dont l'incorporation dans l'ADN réparé est mesurée par autoradiographie. Il convient de prendre soin que la réplication de l'ADN soit inhibée autant que possible, de telle sorte que l'incorporation de matériel radioactif ne signe que la réparation de l'ADN (Unscheduled DNA Synthesis , UDS).

(1) tests UDS in vitro

a) cellules humaines

L'intensité de la réparation est quelque peu supérieure pour les cellules humaines que pour les cellules de rongeurs. Une grande variété de cellules sont utilisables : les lymphocytes normaux (86), les lymphocytes de patients à leucémie, à lupus érythémateux disséminé, à maladie rhumatoïde, les fibroblastes et les cellules HeLa (61).

b) cellules de rongeurs = test de Williams

Un large spectre de types cellulaires a été envisagé: cellules de testicule de souris, oocytes de souris, cellules de cristallin de rat. Les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) ne semblent pas utilisables.

Le test le plus prometteur est celui réalisé à l'aide d'hépatocytes de rat de première culture. Ces cellules contiennent de nombreuses enzymes d'activation métabolique permettant la détection des procancérogènes sans addition supplémentaire de fraction S9. Les méthodes de culture se sont développées : les cellules ne se divisent pas le premier jour ou juste après l'isolement. Il n'est donc pas nécessaire d'ajouter un inhibiteur de la

réplication. Cette technique présente l'avantage de respecter la réalité du métabolisme (le rat est un acétylateur lent chez lequel l'hydralazine est mutagène, à l'inverse du lapin qui est un acétylateur rapide) et de révéler une hépatotoxicité éventuelle. Incontestablement, il s'agit d'un test d'avenir (118).

(2) tests UDS in vivo

a) spermatocytes post-méiotiques de rongeurs

Le principe est d'injecter dans un premier temps un nucléoside radioactif, la thymidine tritiée, dans les testicules, et dans un deuxième temps de traiter les animaux avec le produit testé. Les spermatocytes post-méiotiques, non divisibles, sont isolés et la réparation de l'ADN est mesurée par la quantité de thymidine incorporée en utilisant des procédures de comptage par scintillation liquide (93).

b) épithélium oesophagal de rongeurs

Les cellules de surface de cet épithélium pluristratifié ne se divisant pas, servent de substrat pour ce test (99).

&&) inhibition de la réplication de l'ADN

Le principe est basé sur le fait que la liaison covalente entre l'agent mutagène et l'ADN inhibe la réplication du matériel génétique. Néanmoins, les techniques mesurant cet effet ne sont pas d'une efficacité sûre car les cellules tuées par la toxicité du produit testé faussent les résultats.

(1) in vitro

L'utilisation de cellules HeLa marquées et d'une activation métabolique est décrite (76).

(2) in vivo

Cette méthode s'effectue sur des testicules de souris et présente l'avantage

d'indiquer si la molécule testée agit sur un tissu germinal (32).

&&&) fragmentation de l'ADN

Différentes techniques permettent la détection de cassures d'un brin d'ADN par l'utilisation d'une variété de types cellulaires , aussi bien in vitro qu'in vivo. Néanmoins, la relation entre ces cassures et la mutagénèse est incomplètement connue et la corrélation n'est pas absolue (99, 79).

c) Tests de transformation in vitro

Les tests de transformation in vitro ont une importance prépondérante dans la mesure où le caractère final à détecter est facile à relever (critères morphologiques). L'inconvénient majeur réside dans les repiquages fréquents et nécessaires : ces conditions de culture peuvent augmenter les fréquences des transformations.

/ cellules d'embryon de hamster syrien de première explantation

L'intérêt de telles cellules fraîchement isolées est de posséder une activation métabolique et de présenter un taux de transformation spontanée très faible. De plus, le test est plus rapide qu'avec des cellules de lignées. Parmi les inconvénients , citons une faible durée de vie en culture et une population cellulaire hétérogène (80).

// cellules de lignées

(1) cellules de souris C_3H 10 T 1/2 clone 8

Ce type cellulaire est recommandé car le taux de transformation spontanée est très faible, les cellules possèdent une aryl hydrocarbon hydroxylase (cf. activation métabolique du benzo(a)pyrène) et les foyers transformés sont faciles à discerner (84).

(2) cellules de souris Balb/3 T 3

Certaines sous-lignées possèdent un taux élevé de transformation spontanée de telle sorte que cette méthode ne fait pas l'unanimité (23).

(3) cellules de hamster BHK 21 clone 13

Pour différentes raisons, ces cellules sont considérées comme pré-malignes. Un protocole simple et rapide a été mis au point, basé sur la facilité de ces cellules à pousser sur gélose molle (100).

(4) cellules d'embryon de rat

Dans ce cas, la transformation n'apparaît qu'après plusieurs semaines (30)

(5) cellules transformées viralement

Le principe est de mesurer la capacité d'un agent chimique à augmenter la fréquence de transformation virale (18).

(6) cellules humaines

Ce test utilise essentiellement des fibroblastes normaux (48).

(7) cellules épithéliales

De nombreux cancers atteignent des tissus épithéliaux. Il semble donc important de se servir de ce type cellulaire lors d'un test de transformation in vitro. Les cellules hépatiques de rat sont les plus utilisées (116).

V) *TESTS SUR MAMMIFERES IN VIVO*

Les tests sur mammifères in vivo mesurent les effets mutagènes aussi bien sur des tissus de type germinal que somatique. Leur intérêt est de montrer si la forme active de l'agent mutagène peut atteindre un tissu germinal et, par voie de conséquence, si la mutation peut se transmettre. D'autre part, ces tests ne révèlent que des effets chromosomiques et ne détectent pas les petites mutations. Enfin, ils nécessitent un grand nombre d'animaux et la durée de l'expérimentation est relativement importante.

a) Effets sur la lignée germinale

. - tests sur locus spécifique

Les résultats de ces tests sont basés sur un changement phénotypique (couleur de la robe, des yeux..) de la première génération issue de mâles traités accouplés à des femelles homozygotes récessives pour les loci considérés (92). Les modifications du phénotype peuvent être remplacées par des modifications biochimiques : altération de l'hémoglobine ou d'enzymes (60).

.. - test de translocation

Ce test détecte des translocations durant la spermatogénèse qui entraînent , chez les mâles de première génération, une stérilité ou une réduction de la fertilité (33).

... - anomalies numériques du chromosome sexuel

La perte ou la non-disjonction du chromosome sexuel sont détectées par les différences phénotypiques, issues de caractères liés au sexe, chez les animaux de première génération. Ces effets sont confirmés par une analyse cytogénétique (85).

.... - test létal dominant

Des souris mâles sont traitées, puis accouplées à des intervalles de temps réguliers correspondant aux différentes étapes de la spermatogénèse. Une molécule mutagène, en induisant la formation de spermatozoïdes anormaux, provoque l'apparition d'embryons non viables se traduisant par une diminution du nombre des implantations embryonnaires. Les mutations responsables de ces effets sont des cassures chromosomiques (6). L'agent mutagène est alors appelé un clastogène.

.....- anomalies de sperme

Après un traitement de dix semaines minimum, une étude morphologique du sperme est réalisée (124).

b) Effets sur la lignée somatique

Le principal test est effectué sur des embryons de souris, hétérozygotes pour un caractère, la couleur de la robe. Ceux-ci sont traités in utero et, trois semaines plus tard, la robe des jeunes est examinée. L'effet mutagène est révélé par l'apparition de plages de couleur brune, feu ou grise. Chaque plage est issue d'un clone de mélanocytes qui a subi une mutation de l'allèle responsable du caractère sauvage conduisant à la formation de cellules homozygotes récessives pour ce locus (28).

L'avantage de ce test est de pouvoir examiner une grande population cellulaire. D'autre part, le nombre d'animaux nécessaires est moindre que pour les autres épreuves.

VI) TESTS CYTOGENETIQUES SUR MAMMIFERES

La cytogénétique a pour but l'étude des chromosomes. Ces tests révèlent donc des aberrations chromosomiques et des échanges entre chromosomes, aussi bien in vitro qu'in vivo.

a) Aberrations chromosomiques

§ in vivo

L'étude in vivo révèle les effets de l'agent testé et de ses métabolites sur les chromosomes de lymphocytes. Ceux-ci présentent plusieurs avantages (27).

- ils sont facilement utilisables en grand nombre
- ils circulent dans tout l'organisme, ce qui facilite leur contact avec la molécule
- ils peuvent être stimulés par des mitogènes en culture afin d'effectuer une analyse des chromosomes.

§§ *in vitro*

Les substrats utilisés sont des cellules de lignées de rongeurs, et des fibroblastes ou des lymphocytes humains (71).

b) Echange de chromatides soeurs

§ in vitro

Un échange de chromatide soeur (sister chromatid exchange , SCE) est un échange des produits de la réplication de l'ADN qui peut être visualisé, lors de la métaphase, comme un échange symétrique entre deux chromatides soeurs pour un locus homologue (51). Cette technique utilise essentiellement des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO).

§§ *in vivo*

L'avantage de l'étude in vivo est d'obtenir spontanément une activation métabolique d'une part, et, d'autre part, d'utiliser une variété de tissus : tissu germinal (spermatogonies) ou somatique (lymphocytes)(51).

c) Test du micronucleus

Le principe du test du micronucleus est d'observer d'éventuels reliquats de noyau dans des cellules normalement anucléées. En pratique, l'observation est effectuée sur des érythrocytes polychromatophiles, 24 à 30 heures après le traitement (88).

Ces reliquats sont des fragments de chromosome, issus d'un mauvais fonctionnement de la mitose, qui n'ont pas été expulsés en même temps que le noyau.

III) Les Tests a Moyen Terme

Les tests à moyen terme représentent une nouvelle tendance en cancérogènèse car ils visent à mettre en évidence certaines catégories de molécules carcinogènes, notamment les facteurs épigénétiques. Réalisés in vivo, leur principe de base est le système initiation-promotion. La liste des systèmes initiateur-promoteur cite de nombreuses possibilités. Nous ne présenterons que les quatre principaux modèles.

I) INDUCTION DE TUMEURS CUTANEES CHEZ LA SOURIS

L'effet cancérogène de certaines molécules est détecté soit par des applications continues sur la peau de souris initiant l'apparition de papillomes ou de carcinomes, soit par des injections sous-cutanées induisant des sarcomes. Ensuite, l'action de l'agent initiateur est révélée par l'utilisation de facteurs épigénétiques, promoteurs, tels que les esters de phorbol (108).

En pratique, la molécule testée est appliquée , ou injectée, dans un premier temps. Ce traitement est suivi de l'utilisation d'un promoteur connu. Un deuxième protocole consiste à appliquer un initiateur connu, puis

la molécule testée. L'association de ces expériences conduit à conclure si la molécule est ou n'est pas un initiateur ou un promoteur.

La peau de la souris est un bon matériel car elle possède les enzymes nécessaires à la formation de composés électrophiles. Cependant, chez certaines souches sensibles, des tumeurs lymphoïdes et pulmonaires apparaissent comme des sites secondaires (112).

Ce test est bien adapté à certaines molécules : les hydrocarbures polycycliques, les cancérogènes directs comme les moutardes, la propriolactone ou les nitrosourées. Par contre, les amines aromatiques n'entraînent pas de réponse positive dans ce système, à l'exception de certaines, telle la naphtylamine, probablement parce que ces composés sont convertis en époxyde de la même manière que les hydrocarbures polycycliques.

II) INDUCTION DE TUMEURS PULMONAIRES CHEZ LA SOURIS

ANDERVONT et SHIMKIN furent les pionniers de ce modèle en induisant la formation de tumeurs pulmonaires chez des souches de souris sensibles, comme la souche A/Heston (95). Le protocole présente l'avantage , outre de mesurer le pourcentage d'animaux à tumeurs pulmonaires par rapport aux animaux témoins, d'indiquer la multiplicité des tumeurs. Ce dernier paramètre est important car il signe l'intensité de l'action du cancérogène testé.

Les résultats sont obtenus après 30 à 35 semaines d'essai, parfois moins. Mais l'augmentation de la durée n'est pas souhaitée car le taux de tumeurs pulmonaires des animaux témoins augmente rapidement après 35 semaines et le test perd alors en spécificité.

Généralement, les molécules actives dans ce modèle expérimental sont également cancérogènes lors de test à long terme, mais un résultat négatif n'est pas, pour autant, synonyme d'innocuité.

III) INDUCTION DE TUMEURS MAMMAIRES CHEZ LA RATTE SPRAGUE-DAWLEY

La découverte de SHAY, élégamment étendue par HUGGINS, fut de s'apercevoir que les hydrocarbures polycycliques induisent rapidement des tumeurs mammaires chez de jeunes rattes Wistar, et mieux encore Sprague-Dawley (112). Des résultats positifs sont obtenus en neuf semaines avec les hydrocarbures polycycliques, les amines aromatiques et les nitrosourées.

Comme pour le test précédent, la multiplicité des tumeurs induites est un critère important et une réponse négative n'est pas significative de l'innocuité.

IV) INDUCTION DE FOYERS D'ALTERATIONS DANS LE FOIE DE RONGEURS

Comme nous le précisions dans la première partie, le 2 AA-F provoque, dans le foie de rats, l'apparition de foyers d'altération caractérisés par des critères histologiques et biochimiques, dont une résistance à une sidérose hépatique induite. Ces foyers d'altérations évoluent en hépatocarcinomes sous l'effet d'un promoteur tel que le phénobarbital.

Le protocole consiste à exposer les animaux à la molécule testée, puis au phénobarbital. D'autres animaux sont traités au 2-AAF, puis à la molécule testée. Une comparaison est alors effectuée entre la molécule et le 2-AAF d'une part, et entre la molécule et le phénobarbital d'autre part(83).

Puisque le foie, de par sa fonction métabolique, est la cible de nombreux cancérogènes, ce test présente un intérêt certain.

Une autre possibilité est de mettre à profit la résistance des foyers d'altération à l'effet cytotoxique du 2-AAF (98). Ainsi, l'administration du produit testé est suivie d'une exposition au 2-AAF et d'une hépatectomie partielle. Or, le 2-AAF est métabolisé par les hépatocytes normaux,

de telle sorte qu'ils ne peuvent plus proliférer en réponse à l'hépatectomie partielle. Si le produit testé est un initiateur, les cellules des foyers induits prolifèrent et ceux-ci deviennent extrêmement visibles. Néanmoins, cette approche est techniquement plus délicate que la précédente.

Les tests de cancérogénèse et de mutagénèse sont donc aussi nombreux que très différents, tant dans la méthode que dans le but. La question est maintenant de savoir comment ils s'adaptent à la détection du système initiateur-promoteur.

Troisième Partie

ANALYSE CRITIQUE DES TESTS DE CARCINOGENESE

Toutes les épreuves précédemment citées présentent, certes des avantages, mais également des limites dans la détection des agents initiateurs ou promoteurs. Nous envisagerons ainsi les aspects positifs et négatifs des trois types de tests dans la détection des initiateurs d'une part, et des promoteurs d'autre part. Enfin, nous verrons quelles stratégies sont actuellement recommandées pour l'évaluation du risque cancérogène.

I) Détection des Initiateurs

I) TESTS DE MUTAGENESE

La première partie a révélé qu'un agent initiateur, en créant une lésion génétique, est qualifié de génotoxique. Un tel agent est donc mutagène. Or, les tests à court terme visent à mettre en évidence une action mutagène. Ils participent donc à la détection des agents initiateurs. Mais leur variabilité est telle que la fiabilité de chacun n'est pas au-dessus de tout soupçon. Nous exposerons, dans un premier temps, les facteurs de variabilité des tests de mutagénèse. Ceux-ci nous conduiront, dans un second temps, à envisager la notion de " batterie " de tests.

a) Facteurs de variabilité

Les facteurs de variabilité des tests de mutagénèse sont représentés par le mode d'action de l'agent testé, le type cellulaire utilisé et le métabolisme de la molécule.

Il est acquis que tous les mutagènes n'agissent pas de la même manière. Les mécanismes d'action les mieux étudiés sont l'insertion,

la formation d'adduit et la liaison entre les deux brins de l'ADN (52).

L'insertion est une addition ou une perte de bases azotées, entraînant ainsi un décalage de code. Les produits responsables d'un tel processus sont des agents " intercalants ". C'est, par exemple, le mode d'action des acridines, des actinomycines, de la daunomycine.

La formation d'un adduit conduit à une modification structurale de l'ADN et donc à un mauvais appariement des bases azotées durant la duplication de l'ADN. La conséquence est une substitution de bases azotées. L'adduit se situe soit à l'intérieur de la double hélice, cas des dérivés électrophiles des amines aromatiques, soit il provoque le déplacement de la base à l'extérieur de la double hélice, cas du 2-acétylaminofluorène (55). La liaison entre les deux brins de l'ADN représente un autre type d'adduit. Ce processus gêne la réplication et conduit la cellule vers la mort. L'exemple est donné par les pyrrolizidines. Enfin, certaines mutations apparaissent par un effet " anti-réplication". Les agents responsables,tels que le méthotrexate et les analogues des bases azotées , diminuent la précision des ADN-polymérases.

Ces quelques types de modification du génôme peuvent atteindre tous les organismes, procaryotes ou eucaryotes. La plus grande simplicité de structure des premiers peut, dans une certaine mesure, favoriser le contact entre le mutagène et sa cible, et donc faciliter la mise en évidence d'un tel corps. En revanche, les systèmes eucaryotes sont les seuls à répartir leur matériel génétique au sein de plusieurs chromosomes dont la ségrégation s'effectue pendant la mitose grâce à un système intracellulaire de microtubules. Par conséquent, seuls les eucaryotes sont utilisables pour révéler un dysfonctionnement mitotique. L'exemple est apporté par la colchicine qui bloque la mitose en métaphase. Toutes ces considérations prouvent que le résultat d'un test court dépend en partie du mode d'action

de l'agent testé et du substrat biologique utilisé.

En conclusion, il apparaît que les systèmes eucaryotes détectent essentiellement les agents clastogènes et les poisons mitotiques, alors que les microorganismes procaryotes se limitent à mettre en évidence les mutations ponctuelles (insertion, adduit..). Mais, dans la mesure où une molécule agit de plusieurs façons, de plus amples informations sont obtenues par une association de ces systèmes. La nécessité de cette association est illustrée par les agents intercalants : mutagènes chez les bactéries, ils ne sont pas réellement cancérogènes (52). Nous pouvons donc poser la question de savoir si toutes mutations non réparées entraînent nécessairement une initiation.

Le troisième facteur de variabilité des tests de mutagénèse est le métabolisme de l'agent testé. Pour agir, ce dernier doit pénétrer dans la cellule et,éventuellement,subir une activation métabolique naturelle ou liée à un activateur rajouté.

La pénétration du produit dans la cellule est sous la dépendance de la membrane cellulaire, reflet du métabolisme . Elle contient, en outre, des enzymes spécifiques, les perméases, qui autorisent ou non l'entrée de la molécule au sein de la cellule. Il n'est donc pas étonnant d'obtenir des résultats variables selon le type cellulaire. Le méthotrexate en est un exemple = son effet anti-réplication n'est pas révélé par le test sur Salmonella car il ne pénètre pas dans ces bactéries , alors que les cellules de hamster in vitro y sont sensibles.

L'activation métabolique " naturelle " des agents promutagènes est supportée morphologiquement par le réticulum endoplasmique de la cellule et biochimiquement par des réactions d'oxydation. De récents travaux ont montré que des réactions présentes dans le noyau cellulaire peuvent jouer un rôle, jusque là méconnu, dans la mutagénèse. Enfin, une activation d'origine mitochondriale a été démontrée (52).

Néanmoins, cette bioactivation n'est pas universelle : tous les types cellulaires d'un même organisme ne possèdent pas la voie métabolique

nécessaire à l'activation d'un promutagène. De telles différences s'appliquent également aux espèces et aux souches animales. Le tableau ci-dessous illustre cette notion (44):

Hamster syrien	Effet cancérogène	
	du méthylcholanthrène	de la β-naphtylamine
Souche Bio 15-16	Cancer mammaire et intestinal	-
Souche Bio 1-5	-	Cancer de la vessie

Un composé mutagène ne sera donc pas démasqué par tous les tests de mutagénèse, ce qui pose le problème de la fiabilité de chaque épreuve prise séparément.

La plupart des essais in vitro utilisent une activation métabolique exogène, représentée par l'addition de la fraction S9 d'un homogénat de foie de rat, afin d'activer la molécule testée en métabolique actif. D'autres solutions consistent à ajouter de l'aroclor ou du phénobarbital. Mais rien ne prouve que ces systèmes d'activation agissent sur toutes les molécules testées et sont capables de révéler tous les promutagènes. D'autant que certains artifices peuvent modifier les résultats (3).

Une augmentation de la réponse in vitro est obtenue par :

- une addition d'enzymes d'activation purifiées
- une addition de réactifs chimiques
- une incubation anaérobie.

Une diminution de la réponse in vitro est le résultat :

- d'une addition d'enzymes de désactivation purifiées
- d'une addition de sites nucléophiles compétitifs
- d'un changement de la fraction S9.

Ceci explique dans une certaine mesure les résultats variables observés in vitro et in vivo. L'idéal serait d'utiliser une gamme d'activateurs aussi complète que possible, mais ce progrès reste directement lié à celui de la recherche fondamentale. Toutes ces considérations prouvent qu'il est indispensable de tester un produit à l'aide de plusieurs épreuves judicieusement choisies, combinant les substrats procaryotes et eucaryotes d'une part, et les essais in vivo et in vitro d'autre part.

b) Batterie de tests

Les tests à court terme sont importants car ils détectent la majorité des cancérogènes connus. Certains essais permettent également de mettre en évidence un effet mutagène sur la lignée germinale. Toutefois, cet effet transmissible ne doit pas être confondu avec un effet cancérogène, bien que ces deux objectifs puissent être atteints parallèlement avec une seule et même batterie de tests. Envisageons les aspects positifs et négatifs d'une telle association d'épreuves.

Les avantages résident essentiellement dans l'élimination des faux résultats. En effet, tel test peut ne pas révéler tel cancérogène connu, résultat faux négatif, ou au contraire, déceler un agent inoffensif, résultat faux positif. Une telle association contribue donc à resserer les mailles du filtre et, surtout, à déceler les résultats faux négatifs qui sont une source de danger pour l'homme. De plus, un résultat globalement positif représente un signe d'alarme.

Mais la plupart des tests à court terme ne reproduisent pas l'environnement homéostatique et immunitaire présent dans un organisme vivant, de telle sorte que l'extrapolation d'un résultat positif à l'organisme de mammifère est délicate. D'autre part, l'obtention, même régulière, de résultats négatifs ne suffit pas pour affirmer la non cancérogénicité de la substance en question.

Tous ces éléments, sans en nier l'intérêt, mettent en cause la fiabilité absolue des tests de mutagénèse dans le cadre de la détection des agents initiateurs.

II) TESTS A MOYEN TERME IN VIVO

Ils ont, pour avantage, une durée acceptable de plusieurs semaines, avec un minimum de 10 semaines et un maximum d'un an. Dans ce laps de temps, il est possible de confirmer, à l'aide de protocoles appropriés, si l'agent testé est bien génotoxique et, dans ce cas, s'il s'agit d'un cancérogène complet ou d'un initiateur pur. De plus, ces essais permettent de placer le produit testé dans les conditions de métabolisme, d'environnement homéostatique et immunitaire d'un organisme de mammifère. Les avantages sont donc réels.

Par contre, l'utilisation limitée d'une seule espèce animale pose le problème de l'extrapolation des résultats obtenus à l'homme. Il en est de même pour l'organe cible choisi : peau, pourmon, mamelle ou foie. Pourquoi le produit testé n'agirait pas sur le colon, la vessie ou le pancréas ?

D'autre part, ces tests nécessitent une comparaison entre l'agent mis en cause et un initiateur connu. Or, la sélection d'un initiateur de référence sur des critères uniquement expérimentaux est-elle une attitude objective, tant d'un point de vue statistique que scientifique . En effet, le 2-AAF ,initiateur de référence couramment utilisé pour induire des foyers d'altération dans le foie des rongeurs, entraîne également des hépatocarcinomes chez les lots " récupération". Ceci remet en cause la notion d'initiateur pur.

Enfin, un résultat négatif ne signe pas l'innocuité de la molécule dans la mesure où une courte durée d'exposition ne révèle pas nécessairement un produit faiblement initiateur.

Néanmoins, la présence de deux résultats positifs, batterie de tests de mutagénèse et test à moyen terme in vivo, conduit à penser que le produit présente un haut risque potentiel de cancérogénèse chez l'homme. Ceci est spécialement vrai si les résultats sont obtenus à l'aide de doses modérées et si l'on note une bonne réponse effet-dose.

III) TESTS A LONG TERME

Ils présentent l'avantage de mieux récréer l'environnement nécessaire à l'activation du produit qui est testé pendant toute la vie de l'animal. Le protocole imposé par la législation prévoit , en outre, une observation histologique de tous les organes. Notons que, actuellement, aucun des tests précités ne saurait remplacer cette méthode conventionnelle d'évaluation de la potentialité cancérogène . Et pourtant, les limites sont nombreuses.

L'utilisation continue et prolongée présente l'inconvénient d'attirer les foudres des sociétés de défense des animaux qui remettent en cause le principe même de la toxicologie expérimentale. Le choix des espèces animales pose le problème de l'interprétation et de l'extrapolation des résultats à l'homme. Les animaux de laboratoire sont parfois sujets à une pathologie spontanée, certes connue, mais qui fausse toute l'expérimentation.

Ces tests sont extrêmement laborieux, coûteux et longs. Laborieux de par la rigueur nécessaire des examens cliniques fréquents, de l'administration effective du produit et de son contrôle. Coûteux (3 à 4 millions de francs actuels) de par le nombre d'animaux nécessaires et de par la durée de l'expérimentation. D'un point de vue métabolique, l'utilisation des primates

serait déjà une meilleure approche du risque cancérogène, mais une expérimentation de sept ans est dans cas obligatoire ! D'autant que les singes, en provenance d'Afrique, sont porteurs de parasites et autres agents pathogènes latents qui faussent les paramètres biologiques. A la durée de l'expérimentation proprement dite, il faut ajouter le temps nécessaire à la lecture des coupes histologiques nombreuses et à l'établissement des rapports.

Ce n'est que fortuitement que ces tests révèlent les initiateurs. En effet, certains facteurs exogènes et endogènes peuvent jouer le rôle de promoteur: l'alimentation, la balance hormonale, l'immunosuppression et surtout vraisemblablement l'âge. Dans le cas où le hasard rassemble tous ces éléments, à qui attribuer quoi ? Ils sont donc presque exclusivement orientés vers la détection des cancérogènes complets.

II) Détection des Promoteurs

Les promoteurs posent un problème car ils ne sont pas cancérogènes sensu stricto. Leur détection n'en est que plus difficile . Envisageons de la même manière les avantages et les limites des trois grandes catégories de tests.

I) TESTS DE MUTAGENESE

Ces tests ont été présentés comme n'étant sensibles qu'aux agents génotoxiques. Cependant, quelques épreuves se développent afin de rechercher in vitro une activité promotrice.

L'essai le plus prometteur s'effectue sur cellules de hamster chinois V 79 H GPRT$^+$ et H GPRT$^-$ (106). Les métabolites toxiques formés par les cellules H GPRT$^+$, à partir de la 6-thioguanine, atteignent également les cellules H GPRT$^-$ placées dans la même boîte de Pétri grâce au principe de la " coopération métabolique ". Or, l'effet d'un promoteur est d'inhiber le

processus de coopération métabolique, ce qui permet aux cellules H GPRT$^-$ de se développer. (cf.p.87 et 88).

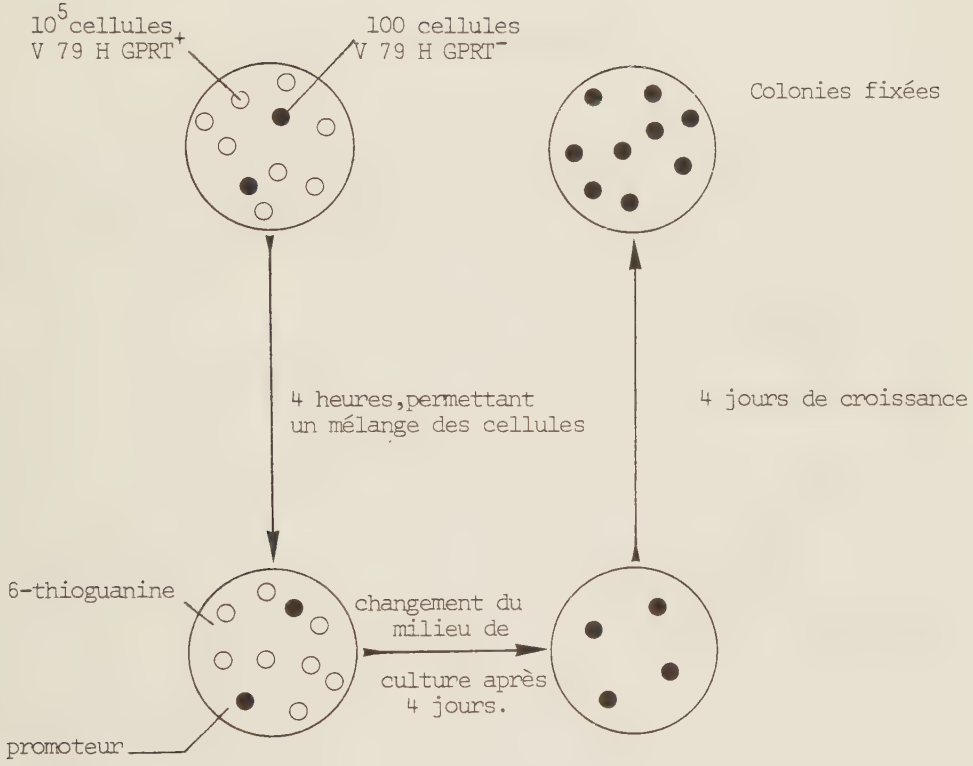
Néanmoins, la contribution de ces tests dans la stratégie actuelle n'est pas encore clairement définie.

II) TESTS A MOYEN TERME IN VIVO

C'est l'intérêt majeur de ces tests, avec la recherche des initiateurs. L'étude d'une activité promotrice s'effectue également par comparaison à un promoteur connu, tel le phénobarbital dans le cas des foyers d'altération dans le foie de rongeurs. Comme précédemment, la notion de comparaison nous conduit à celle de référence.

III) TESTS A LONG TERME

Dans certains cas, ils sont susceptibles de mettre en évidence une activité promotrice en révélant une augmentation du taux des tumeurs spontanées des animaux traités par rapport aux animaux témoins. Un exemple est l'utilisation d'immunosuppresseur qui stimule les néoplasmes d'origine virale.



TEST DE PROMOTION IN VITRO

Liste des composés testés

Composé	Réponse in vitro	Réponse in vivo
TPA	+++	+++
Phorbol 12,13 didecanoate	++	++
Phorbol	-	-
Phénobarbital	++	++
DDT	++	+
Anthralin	+	+
Saccharine pure	+	+
Saccharine impure	+	+
Acide désoxycholique	++	++
Acide lithocholique	++	+

En conclusion, il apparaît que la détection des promoteurs est essentiellement obtenue par les tests à moyen terme in vivo. Une étude de cancérogénèse devra débuter par des essais rapides, peu coûteux et le plus fiables possibles. Les molécules à haut risque seront éventuellement abandonnées au profit d'autres plus promotteuses. C'est ce que nous proposons d'étudier dans les stratégies actuelles recommandées.

III) Stratégies actuelles recommandées

En ce qui concerne les tests de mutagénèse, les stratégies proposées ou recommandées par des autorités de tutelle diffèrent. Le tableau ci-dessous montre les exigences des autorités de la C.E.E et du Japon, et les recommandations de deux spécialistes : WILLIAMS et ASHBY .

	WILLIAMS (112)	ASHBY (3)	C.E.E (21)	JAPON (46)
Mutagénèse bactérienne	+	+	+	+
Réparation de l'ADN	+ sur hépatocytes			+ sur bactéries
Transformation in vitro	+	+		
Culture de cellules de mammifères		+	+ ou drosophiles	
Mutagénèse sur mammifère in vivo	+			+ test létal dominant
Aberrations chromosomiques in vitro		+	+	+
Echange de chromatides soeurs	+			
Test du micronucleus			+	+
Total	5	4	4	5

De ce tableau, nous pouvons conclure que :

- tous sont unanimes à propos d'un test de mutagénèse bactérienne
- tous utilisent au moins un test cytogénétique
- tous utilisent au moins un test sur culture de cellules.

Il est à remarquer la relative souplesse de ces recommandations. Ainsi, la C.E.E préconise un test sur culture de cellules de mammifères ou sur drosophiles, alors que WILLIAMS exige le test de mesure de la réparation de l'ADN sur hépatocytes. Le Japon réclame le test létal dominant tandis que WILLIAMS propose un test de mutagénèse sur mammifères in vivo.

Les tests à moyen terme in vivo ne sont pas obligatoires. Cependant, ils sont importants à considérer car un résultat positif évite d'avoir recours aux tests à long terme, économisant ainsi du temps et de l'argent. Dans cet esprit, WILLIAMS et WEISBURGER ont proposé un protocole général visant à apprécier le risque carcinogène des nouvelles molécules (112):

- A - structure chimique
- B - tests à court terme
- B'- point de décision sur la poursuite des études d'après les résultats de A et B
- C - tests à moyen terme in vivo
- C'- point de décision sur la poursuite des études d'après les résultats de A, B et C
- D - tests à long terme
- E - évaluation finale.

Cependant, il faut toujours avoir présent à l'esprit qu'une réponse négative à tous ces tests, compte-tenu des caractéristiques métaboliques pouvant varier entre les espèces, les souches et les types cellulaires,n'implique pas une certitude d'innocuité de la molécule.

CONCLUSION

Cette étude a souligné l'intérêt des tests à court et moyen terme dans la recherche d'un éventuel pouvoir cancérogène des molécules nouvellement synthétisées. En effet, ils peuvent permettre de révéler précocément une telle activité et donnent des indications sur le mécanisme d'action. Ils écartent donc des expérimentations plus longues et onéreuses bon nombre de produits à activité cancérogène. Ainsi, les tests à long terme peuvent être réservés aux molécules les moins suspectes pour lesquelles ils constituent une dernière et nécessaire vérification d'innocuité. Ils sont d'ailleurs, à juste titre, rendus obligatoires par la loi.

Néanmoins, quelque soit la rigueur des tests mis en oeuvre, le problème de l'extrapolation à l'homme des résultats obtenus sur l'animal persistera. Notons que, jusqu'à maintenant , tous les composés actifs chez l'homme se sont révélés positifs chez l'animal et, à l'inverse, espérons que l'association de ces épreuves permette de circonscrire avec certitude l'innocuité des agents testés.

VU : le Professeur de l'Ecole Vétérinaire
Rapporteur
Pr. VAN HAVERBEKE

VU : le Directeur de l'Ecole Vétérinaire
Pr. LAUTIE

VU : le Président de la thèse
Pr.GUILHEM

VU et permis d'imprimer
Toulouse, le 19. 5. 1982
Le Président de l'Université Paul Sabatier.

P.D. BANCEL

BIBLIOGRAPHIE

1) AMES B.N, DURSTON W, YAMASAKI E et LEE F - Carcinogens are mutagens : a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection - Proc. Natl.Acad. Sci(USA),1973b, 70, 2281-2285

2) ARMUTH V et BERENBLUM I - Cancer Research, 1974, 34, 2704

3) ASHBY J- Tests for potential carcinogens : unresolved problems - In : Stich H.F. and SAN R.H.C. (Eds) Short-term tests for chemical carcinogens, Springer Verlag, New York, 1981

4) BANNASCH P - Cytology and cytogenesis of neoplastic hepatic nodules - Cancer Res. 1976, 36, 2555-2562

5) BARRETT J.C., DIAS N.E et TS'O P.OP - A mammalian cellular system for the concomitant study of neoplastic transformation and somatic mutation - Mutation Res. 1978, 50, 121-136

6) BATEMAN A.J. - The dominant lethal assay in the male mouse, in : Kilbey B.J, Legator M, Nichols W. et Ramel C(Eds), Handbook of mutagenicity test procedures, Elsever, Amsterdam 1977 p 325-334

7) BERENBLUM I - Cancer Research, 1941a, 1, 44

8) BERENBLUM I - Cancer Research, 1941b, 1 , 807

9) BIGNAMI M, MORPURGO G, PAGLIANI R, CARERE A , CONTI G et di GIUSEPPE G - Non-disjunction and crossing-over induced by pharmaceutical drugs in Aspergillus nidulans - Mutation Res. 1974, 26, 159-170

10) BLUMBERG P.H, DRIEDGER P.E et ROSSON P.W. - Nature 1976, 264, 446-447

11) BOCK F.G. et BURNS R. - J. Natl. Cancer Inst. 1963, 30, 393

12) BOUTWELL R.K et BOSCH D.K. - Cancer Research, 1959, 19, 413

13) BOWDEN G.T. et BOUTWELL R.K.- Cancer Research 1974, 34, 1552

14) BROWNS H.S., JEFFREY A.M. et WEINSTEIN I.B.- Formation of DNA adducts in 10 T 1/2 mouse embryo fibroblasts incubated with benzo(a)pyrene or dihydrodiol derivatives - Cancer Res. 1979, 39, 1673-1677

15) BURGAT.SACAZE V - Carcinogénèse chimique. Cours C.E.S. d'Anatomie pathologique des animaux de laboratoire.Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 1981

16) CAMERON R., KELLEN J, KOLIN A., MALKIN A. et FARBER E. - Gamma-glutamyl transpeptidase in putative premalignant liver cell populations during hepatocarcinogenesis - Cancer Res. 1978, 38, 823-829

17) CARCINOGENICITY TESTING of medicinal products Reference III/1607/79 EN.

18) CASTO B.C., MEYERS J, et DIPAOLO J. - Enhancement of viral transformation for evaluation of the carcinogenic or mutagenic potential in inorganic metal salts - Cancer Res. 1979, 39, 193-198

19) CLIVE D, JOHNSON K.D., SPECTOR J.F.S., BATSON A.G. et BROWN M.M.M. - Validation and charactirization of the L 5178 T /$TK^{+}/^{-}$ mouse lymphoma mutagen assay system - Mutation Res. 1979, 59, 61-108

20) COLBURN N.H. et BOUTWELL R.K. - Cancer Research 1966, 26, 1701

21) CUTHBERT M.F. - Point de vue des autorités de tutelle de la C.E.E sur les études de mutagénèse - Colloque " QUO VADIS " laboratoire Clin Midy, Montpellier février 1981

22) DIAMOND L., O'BRIEN T.G. et ROUERA G. - Nature, 1977, 269 , 247-249

23) DIPAOLO J.A., TAKANO K et POPESCU N.C. - Quantitation of chemically induced neoplastic transformation of BALB/3 T3 cloned cell lines - Cancer Res. 1972b, 32, 2686-2695

24) DIPPLE A et SLADE T.A. - Eur. J. Cancer 1971, 7, 473

25) DIREDGER P.E. et BLUMBERG P.M. - Cancer Research 1977, 37 , 3257-3265

26) ELESPURU R.K. - A biochemical phage induction assay for carcinogens in : Stich H.F. et SAN R.H.C. (Eds), Short-term tests for chemical carcinogens, Springer Verlag, New York, 1981

27) EVANS H.J - Cytological methods for detecting chemical mutagens in : A Hollaender (Ed) Chemical mutagens = Principles and Methods for their Detection , vol.4, Plenum, New York, 1976, p.1-29

28) FAHRIG R - The mammalian spot test : a sensitive in vivo method for the detection of genetic alterations in somatic cells of mice, in : A.Hollaender and F.J.de SERRES (Eds) Chemical Mutagens = Principles and Methods for their Detection, vol.5, Plenum,New York 1978, p.151-175

29) FIALA S, MOHINDRU A., KETTERING W.G., FIALA A.E. et MORRIS H.P. - Glutathione and gamma-glutamyl transpeptidase in rat during chemical carcinogenesis - J. Natl. Cancer Inst. 1976, vol.57, n°3, 591-598

30) FREEMAN A.E., IGEL H.J., HUEBNER, R.J., PRICE P.J., YOUNG J.C. et MAR YACK J.M. - Morphological transformation of rat embryo cells induced by diethylnitrosamine and murine leukemia viruses - J. Natl.Cancer Inst. 1970, 44, 65-78

31) FREESE E. - Molecular mechanisms of mutations, in : A.Hollaender (Eds) Chemical Mutagens= Principles and Methods for their Detection, vol.1, Plenum, New York, 1971

32) FRIEDMAN M.A. et STAUB J. - Inhibition of mouse testicular DNA synthesis by mutagens and carcinogens as a potential simple mammalian assay for mutagenesis - Mutation Res. 1976, 37, 67-76

33) GENEROSO W.M., CAIN K.T., HUFF S.W., et GOSSLEE D.G.- Heritable translocation test in mice , in = A.Hollaender and F.J.de Serres (Eds) Chemical Mutagens = Principles and Methods for their Detection, vol 5, Plenum, New York, 1978, p.55-77

34) GORIN N.C - Le matériel génétique, dans : Le Concours Médical, supplément au n°45, Nov. 1971

35) GORIN N.C. - Génétique des eucaryotes, dans : Le Concours Médical, supplément au n°50, déc. 1971

36) GREEN M.H.L. et MURIEL W.J. - Mutagen testing using TRP^+ versions in Escherichia coli - Mutation Res. 1976a, 38, 3-32

36') GREEN M.H.L., MURIEL W.J. et BRIDGES B.A. - Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens- Mutation Res. 1976b, 38, 33-42

37) GRISEMER R.A., SQUIRE R.A., STEWART H.L., CASEY H.W., MURPHY E.D., NIELSEN S.W., STANTON M.F. - Histologic typing of liver tumors of the rat - J. Natl. Cancer Inst.1980, vol.64, n°1, 178-206

38) GUIDELINES for carcinogen bioassay in small rodents - National Cancer Institute - Carcinogenesis technical report series n°1, fév.1976

39) GWYNN R.H. et SALAMAN M.H. - Br.J. Cancer, 1953, 7, 482

40) HECKER E. - Cancer Research, 1968, 28, 2338

41) HENNINGS H., MICHAEL D., et PATTERSON E. - Cancer Research, 1973, 33,3130

42) HICKS R.M., WAKEFIELD J.St.J, et CHOWANIEC J. - Chem.Biol. Interact. 1975, 11, 225

43) HIROTA N, WILLIAMS G.M. - The sensitivity and heterogeity of histochemical markers for altered foci involved in liver carcinogenesis - Am. J. Path. 1979, vol.95, n°2, 317-328

44) HOMBURGER F, ADAMS R.A., SOTO E. et VAN DONGEN C.G. - Susceptibility and resistance to chemical carcinogens in inbred syrian hamsters , in= Progress in Experimental Tumor Research, vol. 24, p.215-221, Karger, Basel, 1979

45) HUBERMAN E et SACHS L. - Cell-mediated mutagenesis of mammalian cells with chemical carcinogens - Int. J. Cancer 1974, 13, 326-333

46) ISHIDATE Jr - Recommandations des autorités de tutelle du Japon sur les études de mutagénèse - Colloque " QUO VADIS " Laboratoire Clin Midy, Montpellier, fev. 1981

47) JACOBS L et DEMARS R. - Quantification of chemical mutagenesis in diploid human fibroblasts = induction of azaguanine-resistant mutants by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-Mutation Res. 1978, 53, 29-53

48) KAKUNAGA T - Neoplastic transformation of human diploid fibroblast cells by chemical carcinogens - Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 1978, 75; 1334-1338

49) LANKAS G.R., BAXTER C.S., et CHRISTIAN R.T. - Mutation Res. 1977, 45, 153-156

50) LASNE C., GENTIL A. et CHOUROULINKOV I. - Brit.J. Cancer 1977, 35, 722-729

51) LATT S.A., ALLEN J.W., ROGERS W.E. et JEURGENS L.A. - In vitro and in vivo analysis of sister chromatid exchange formation in : Kilbey B.J., Legator M. Nichols W.W. et Ramel C (Eds) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier, Amsterdam, 1977

52) LEGATOR M.S.,et RINKUS S.J. - Mutagenicity testing problems in application in : Stich H.F et SAM R.H.C. (Eds), Short-term Tests for Chemical Carcinogens, Springer Verlag, New York 1981

53) LEPINE R.L - Génétique, ediscience, 1975

54) LE TALEC M. - Détermination du pouvoir mutagène des substances chimiques. Intérêt pour l'évaluation du pouvoir cancérogène - Thèse Doct.Vét Alfort 1979, n°77

55) LEVINE A.F., FINK L.M., WEINSTEIN I.B. et GRUNBERGER D. - Effect of N-2 acetylaminofluorene modification on the conformation of nucleic acids - Cancer Res. 1974, 34, 319-327

56) LEVINE L. et HASSID A. - Biochem. Biophys. Res. Comm. 1977,79, 477-484

57) LOPRIENO N, BARALE R., BAUER C., BARONCELLI S, BRONZETTI G, CAMMELLINI A CINCI A, CORSI G., LEPORINI C, NIERI R, NOZZOLINI M. et SERRA C. - The use of different test systems with yeast for the evaluation of chemically induced gene conversions and gene mutations - Mutation Res. 1974, 25, 197-217

58) MC GREGOR J.F. - J. Natl. Cancer Inst. 1976, 56, 429

59) MAHER V., MC CORMICK J.J., GROUER P.L. et SIMS P.L. - Effect of DNA repair on the cytotoxicity and mutagenicity of polycyclic hydrocarbon derivatives in normal and xeroderma pigmentosum human fibroblasts Mutation Res. 1977, 43, 117-138

60) MALLING H.V. et VALCOVIC L.R.- A biochemical specific locus mutation system in mice - Arch. Toxicol. 1977, 38, 44-51

61) MARTIN C.N., MC DERMID .A.C et GARNER R.C. - Testing of known carcinogens and non carcinogens for their ability to induce unscheduled DNA synthesis in HeLa cells - Cancer Res. 1978, 38, 2621-2627

62) MESELSON M et RUSSEL K - Comparaison of carcinogenic and mutagenic potency in = H.Hiatt, J.Watson et K. Winsten (Eds) Origins in Human Cancer Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1977, 1473-1482

63) MOHN G.R., et ELLENBERGER J. - The use of Escherichia coli K-12/343/313 (λ) as a multi-purpose indicator strain in various mutagenicity testing procedures, in = B.J Kilbey, M.Legator, W.Nichols et C. Ramels (Eds), Handbook of Mutagenicity Test, Procedures, Elsevier, Amsterdam, 1977, p.95-118

64) MONDAL S. et HEIDELBERG C. - Transformation of C3H 10 T1/2 clone 8 mouse embryo fibroblasts vy UV irradiation and a phorbol ester - Nature 1976, 260, 710-711

65) MONDAL S , BRANBOW D.W. et HEIDELBERG C. - Cancer Research 1976, 36, 2254-22

66) MOREAU P., BAILONE A et DEVORET R - Prophage λ induction in Escherichia coli K-12 envA uvr B = a highly sensitive test for potential carcinogens - Proc. Natl. Acad. Sci (USA), 1976, 73, 3700-3704

67) MOTTRAM J.C. - J. Path. Bacteriol. 1944a, 56, 181

68) MUKAI F et TROLL W. - Ann. N.Y.Acad. Sci. 1969, 163, 828

69) NARISAWA T., MAGADIA N.E., WEISBURGER G.H. et WYNDER E.L. - J. Natl. Cancer Inst. 1974, 53, 1093

70) NATIONAL CANCER İNSTITUTE - Workshop on tumor promotion and cofactors in carcinogenesis - Cancer Res. 1977, 37, 3461-3463

71) NICHOLS W.W, MILLER R.C. et BRADT C. - In vitro anaphase and metaphase preparations in mutation testing in : Kilbey B.J, Legator M, Nichols W et Ramel C (Eds), Handbook of Mutagenicity Test Procedures Elsevier, Amsterdam, 1977, p.225-233

72) O'BRIEN T.G. et DIAMOND L. - Cancer Research, 1977, 37, 3895-3900

73) OLIVE G. - Recommandations des autorités de tutelle concernant les études de cancérogénèse - Colloque " QUO VADIS " laboratoire Clin Midy Montpellier février 1981

74) O'NEIL J.P., BRIMER P.A., MACHANOFF R., HIRSCH G.P. et HSIE A.W. - A quantitative assay of mutation induction at the H GPRT locus in chinese hamster ovary cells : development and definition of the system - Mutation Res. 1977a, 45; 91-101

75) ONG T.M. - Development of a Neurospora test system useful in the detection of chemical mutagens and carcinogens in the environment in : Felkner I.C. (Ed) Microbial Testers for Chemical Carcinogens, Marcel Dekker, New York 1979

76) PAINTER K.B.- DNA synthesis inhibition in HeLa cells as a simple test for agents that damage human DNA - J. Environm.Path. Toxicol. 1978, 2, 65-78

77) PERAINO C, FRY R.J.M., STAFFELAT E. et CHRISTOPHER J.P. - Cancer Research 1975, 35, 2884

78) PETERSON A.R., MONDAL S., BRANKOW D.W., THON W. et HEIDELBERG C. - Cancer Research, 1977, 37, 3223-3227

79) PETZOLD G.L., SWENBERG J.A.- Detection of DNA damage induced in vivo following exposure of rats to carcinogens - Cancer Res. 1978, 38, 1589-1594

80) PIENTA R.J., POILEY J.A., LEBHERZ W.B.- Morphological transformation of early passage golden syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable in vitro bioassay for identifying diverse carcinogens - Int. J. Cancer 1977a, 19, 642-655

81) POLONOVSKI M - Biochimie médicale - fasc. I, 10ème edt. Masson et Cie, (Eds)

82) PUGH T.D. et GOLDFARB S. - Quantitative histochemical and autoradiographic studies of hepatocarcinogenesis in rats fed 2- acetylamino-fluorene followed by phenobarbital - Cancer Res. 1978, 38, 4450-4457

83) REMANDET B - Les benzodiazépines sont-elles carcinogènes ? Thèse Doct. Vet. Toulouse, 1981

84) REZNIKOFF C.A., BERTRAM J.S., BRANKOW D.W. et HEIDELBERG C.- Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C3H mouse embryo cells sensitive to post confluence inhibition of cell division - Cancer Res. 1973, 33, 3239-3249

85) RUSSELL L.B. - Numerical sex-chromosome anomalies in mammals = their spontaneous occurence and use in mutagenesis studies , in = A Hoallaender (Eds), Chemical Mutagens : Principles and Methods for their Detection, vol. 4 ,New York, 1976, p.55-91

86) SAN R.H.C. et STICH H.F - DNA repair synthesis of cultured human cells as a rapid bioassay for chemical carcinogens - Mutation Res. 1975, 16, 284-291

87) SCHERER E. et EMMELOT P. - Kinetics of induction and growth of enzyme-deficient islands involved in hepatocarcinogenesis - Cancer Res. 1976, 36, 2544-2554

88) SCHMID W - The micronucleus test for cytogenetic analysis, in = A. Hollaender (Ed), Chemical Mutagens : Principles and Methods for their Detection, vol.4, Plenum, New York, 1976, p.31-53

89) SCRIBNER J.D. - J. Natl. Cancer Inst. 1973, 50, 1717

90) SCRIBNER J.D. et SLAGA T.J. - Cancer Res. 1973a, 33, 542

91) SCRIBNER J.D et SLAGA T.J. - J. Natl. Cancer Inst. 1975, 54, 491

92) SEARLE A.G - The specific locus test in the mouse - Mutation Res. 1975,31, 277-290

93)SEGA G.A., OWENS J.G. et CUMMING R.B. - Studies on DNA repair in early spermatid stages of male mice after in vivo treatment with methyl, ethyl, propyl and isopropyl methane sulfonate - Mutation Res. 1976, 36, 193-212

94) SETALA K - Prog. Exp. Tumor Research, 1960, 1, 225

95) SHIMKIN M.B. et STONER G.D. - Lung tumors in mice :application to carcinogenesis bioassay - Adv. Cancer Res. 1975, 21, 2-58

96) SHUBIK P. et SAFFIOTTI U. - Proc. Am. Ass. Cancer Res. 1954, 1, 45

97) SLATER E.E., ANDERSON M.D. et ROSENKRANZ H.S. - Rapid detection of mutagens and carcinogens - Cancer Res. 1971, 31, 970-973

98) SOLT D.B., MEDLINE A. et FARBER E. - Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis - Am. J. Path. 1977, 88, 595-610

99) STICH H.F et KOROPATNICK D.J. - The adaptation of short-term assays for carcinogens to the gastro-intestinal system, in : E.Farber (Ed). Pathophysiology of Carcinogenesis in Digestive Organs, Univ. of Tokyo Press, 1977, p.121-134

100) STYLES J.A. - A method for detecting carcinogenic organic chemicals using mammalian cells in culture - Br. J. Cancer, 1977, 36, 558-563

101) SUSS R, KREIBICH G., KINZEL V - Europ. J. Cancer, 1972, 8, 299-304

102) TANOOKA H - Development and applications of Bacillus subtilis test systems for mutagens , involving DNA-repair deficiency and suppressible auxotrophic mutations - Mutations Res. 1977, 42 12-32

103) THILLY W.G. - Phenotypic lag and mutation to 6-thioguanine resistance in diploid human lymphoblasts - Mutation Res.1978a, 50, 137-144

104) TROSKO J.E. et CHU E.H.Y - Adv. Cancer Res. 1975, 21, 391

105) TROSKO J.E., CHANG C., YOTTI L.P. et CHU E.H.Y - Cancer Research 1977, 37, 188-193

106) TROSKO J.E., YOTTI L.P., DAWSON B. et CHANG C.- In vitro assay for tumor promoters, in : Stich H.F. et San R.H.C. (Eds) , Short-term Tests for Chemical Carcinogens, Springer Verlag, New York 1981

107) VAN DUUREN B.L., Ann. N.Y.Acad. Sci. 1969, 163, 633

108) VAN DUUREN B.L., SMITH A.C., et MELCHIONNE S.R. - Effect of aging in two-stage carcinogenesis on mouse skin with phorbol, myristate acetate as promoting agent - Cancer Res. 1978b, 38, 865-866

109) WATANABE K et WILLIAMS G.M. - Enhancement of rat hepatocellular-altered foci by the liver tumor promoter phenobarbital - evidence that foci are precursors of neoplasms and that the promoter acts on carcinogen-induced lesions - J. Natl. Cancer Inst. 1978, Vol.61, n°5, 1311-1314

110) WEINSTEIN I.B., WIGLER M. et PIETROPAOLO C. - in = Hiatt H.H.,Watson J.D. et Witsen J.A. (Eds), Origins of Human Cancer, Cold Spring Harbor, Laboratory New York, 1977

111) WEISBURGER G, MADISON R.M., WARD J.M., VIGUERA C. et WEISBURGER E.K - J. Natl.Cancer Inst. 1975, 54, 1185

112) WEISBURGER J.H. et WILLIAMS G.M. - Chemical Carcinogens, in = Casarett et Doull's Toxicology, 2ème edt., chap. 6, 84-138, 1980

113) WENNER C.E., HACKNEY J., KIMELBERG H.K. et MAYHEN E. - Cancer Research, 1974, 34, 1731-1737

114) WIGLER M et WEINSTEIN I.B. - Nature 1976, 259, 232-233

115) WIGLER M, DEFEO D. et WEINSTEIN I.B. - Cancer Research, 1978, 38, 1434-1437

116) WILLIAMS G.M., ELLIOT J.M. et WEISBURGER J.H. - Carcinoma after malignant conversion in vitro of epithelial-like cells from rat liver following exposure to chemical carcinogens - Cancer Res. 1973, 33, 606-612

117) WILLIAMS G.M., TONG C., et BERMAN J.J. - Characterization of analog resistance and purine metabolism of adult rat-liver cell 8-aza-guanine-resistant mutants - Mutation Res. 1978, 49, 103-115

118) WILLIAMS G.M. - The detection of chemical mutagens by DNA repair and mutagenesis in liver cultures, in : A.Hollaender et F.J. de Serres (Eds), Chemical Mutagens : Principles and Methods for their Detection, vol. 6, 1979b

119) WITSCHI H.P., WILLIAMSON D. et LOCK S -J.Natl. Cancer Inst.1977, 58, 301

120) WOOD A.W, LEVIN W., THOMAS P.E., RYON D., KARLE J.M., YAGI H., JERINA D.M. et CONNEY A.H. - Metabolic activation of dibenzo(a,h) anthracene and its dihydrodiols to bacterial mutagens- Cancer Res. 1978, 38, 1967-1973

121) WORLD HEALTH ORGANIZATION - Principles for the testing and evaluation of drugs for carcinogenicity- WHO Tech. Rep. Ser. n°426, Geneve

122) WURGLER F.E., SOBELS F.H. et VOGEL E. - Drosophila as assay system for detecting genetic changes, in : Kilbey B.J., Legator M, Nichols W et Ramel C (Eds) ,Handbook of Mutagenicity Test ,Procedures Amsterdam , Elsevier, 1977, p.335-373

123) WYERS M - Carcinogénèse virale - Cours C.E.S. Anatomie pathologique des animaux de laboratoire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse 1981

124) WYROBEK A.J. et BRUCE W.R. - Chemical induction of sperm abnormalities in mice - Proc. Natl. Acad. Sci (USA), 1975, 72, 4425-4429

125) YUSPA S.H., BEN T. ,PATTERSON E., MICHAEL D., ELGJO K. et HENNINGS H. - Cancer Research 1976, 36, 4062-4068

126) Zur HAUSEN H, O'NEILL F.J., FREESE U.K., et HECKER E. - Nature, 1978, 272, 373-375

127) ZIMMERMANN F.K. - Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast Saccharomyces cerevisioe - Mutation Res. 1975, 31, 71-86